

DIRCE FERREIRA LUZ

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
PROTEÍNA RECOMBINANTE GmSBP2/S64 DA SOJA (*Glycine max*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

DIRCE FERREIRA LUZ

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
PROTEÍNA RECOMBINANTE GmSBP2/S64 DA SOJA (*Glycine max*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de junho de 2006.

Prof^ª Maria Cristina Baracat Pereira
(Co-Orientadora)

Prof^ª Marli Lourdes de Oliveira
(Co-Orientadora)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Dr. Francisco Javier Medrano Martín

Prof^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por ter-me possibilitado a execução deste trabalho, pois sem Ele nada disso teria acontecido.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo apoio acadêmico e institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À Professora Dra. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, principalmente pela confiança em mim depositada, além da orientação, do apoio, das sugestões e do acompanhamento durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Francisco Javier M. Martín, por me orientar na realização de todos os ensaios bioquímicos realizados, como também pela amizade e apoio incalculáveis.

À minha mãe Eulair e à minha irmã Marisi, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida e por não terem medido esforços para que eu conseguisse completar mais uma etapa em minha carreira profissional.

Ao meu esposo Marcus Vinicius M. de Oliveira, pelo amor, incentivo e compreensão proporcionados em todos os momentos.

BIOGRAFIA

DIRCE FERREIRA LUZ, filha de Dely Gomes Luz e Eulair Soares Ferreira, nasceu em 30 de março de 1978, em Janaúba, MG.

Em dezembro de 2000, graduou-se em Biologia pela Universidade Estadual de Montes Claros, em Montes Claros, MG.

Em março de 2001, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em 26 de fevereiro de 2003.

Em março de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Bioquímica Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 09 de junho de 2006.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Proteínas de armazenamento	1
1.2. Transporte de sacarose	6
1.3. Proteína S64	8
1.4. Família CUPIN	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Reagentes.....	15
2.2. Indução da proteína recombinante	16
2.2.1. Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis	17
2.2.2. Purificação da proteína recombinante.....	18
2.2.3. Renaturação da proteína recombinante.....	19
2.3. Espalhamento dinâmico de luz	19
2.4. Espectroscopia de absorção	20
2.4.1. Determinação da concentração de proteína S64 recombinante	20
2.4.2. Dicroísmo circular	20

	Página
2.4.3. Desnaturação térmica	21
2.4.4. Estimativa da estrutura secundária	21
2.5. Fluorescência.....	21
2.5.1. Ligação à sacarose	21
2.6. Ligação de GTP	22
2.7. Apagamento de fluorescência intrínseca da proteína.....	23
2.8 Desnaturação química	23
2.9. Efeito do pH	23
2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida	23
2.11. Comparação de seqüências	24
2.12. Alinhamento de seqüências	24
2.13. Predição da estrutura secundária	24
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Expressão da proteína S64 recombinante e purificação da fração insolúvel.....	25
3.2. Análise da seqüência da proteína S64 recombinante.....	25
3.3. Classificação da proteína S64 recombinante.....	27
3.4. Predição de segmentos transmembrânicos	30
3.5. Predição de estrutura secundária	30
3.6. Dicroísmo circular	33
3.7. Fluorescência.....	34
3.7.1. Apagamento de fluorescência.....	35
3.8. Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	38
3.9. Efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca.....	39
3.10. Estabilidade da proteína S64 recombinante	40
3.11. Ligação de ANS e Bis-ANS.....	42
3.12. Ligação de sacarose e GTP.....	43
3.12.1. Ligação de sacarose medida por fluorescência	43
3.12.2. Ligação de sacarose medida por dicroísmo circular	44
3.12.3. Ligação de GTP por ultracentrifugação.....	45
3.12.4. Efeito da sacarose e do GTP sobre o estado de oligomerização.....	46

	Página
3.12.5. Efeito da sacarose e do GTP sobre o apagamento de fluorescência.....	46
3.13. Expressão e purificação da proteína S64 recombinante em grande escala para cristalização	49
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS	64

RESUMO

LUZ, Dirce Ferreira, D. S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2006.
Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da proteína recombinante GmSBP2/S64 da soja (*Glycine max*). Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Orientadoras: Maria Cristina Baracat Pereira e Marli Lourdes de Oliveira.

A proteína de ligação à sacarose (SBP) pertence à família das proteínas cupim e é relacionada estruturalmente às proteínas de armazenamento do tipo vicilinas. Nesta investigação, a SBP foi expressa em *E. coli* e grandes quantidades da proteína foi acumulada na fração insolúvel como agregados, proteína desnaturada. A renaturação da proteína purificada se deu com a remoção progressiva da uréia no tampão de renaturação, que continha um sistema de retirada de óxido (2 mM de glutathione reduzida e 0,2 mM de glutathione oxidada) e glicerol 5% (v/v) como um agente estabilizador de proteína. A renaturação da proteína foi monitorada usando o dicróismo circular na faixa do UV distante (CD), a fluorescência intrínseca, e o apagamento por acrilamida, KCl e KI. A porcentagem da estrutura secundária da proteína renaturada, que foi calculada com base no espectro de CD, foi consistente com aquela obtida pelo modelamento teórico com grande predominância da estrutura de beta barril (42%) sobre a alfa-hélice (9,9%). O máximo da emissão de fluorescência de 303 nm para a SBP indicou que o triptofano fluorescente foi

completamente internalizado dentro de um ambiente altamente hidrofóbico. Não obstante, o apagamento do triptofano pela acrilamida, KI e CsCL e respectiva constante de Stern-Volmer (K_{sv}) de $23,5 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$, $16,1 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}$ e $4,9 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$ indicam que os resíduos de triptofano fluorescentes foram bastante acessíveis aos apagadores e, conseqüentemente, expostos ao solvente. Foi medida também a constante de dissociação de equilíbrio (K_d) da ligação da sacarose por titulação da fluorescência usando a proteína renaturada. A baixa afinidade de ligação da sacarose ($K_d = 2,79 \pm 0,22 \text{ mM}$) à proteína renaturada foi similar àquela da proteína nativa purificada das sementes de soja. Coletivamente, os resultados apontam que a estrutura enovelada da proteína renaturada é similar à proteína SBP nativa. Como um membro da família das proteínas bicupim que incluem proteínas de armazenamento de semente altamente estáveis, foi de interesse determinar a estabilidade estrutural da SBP. As desnaturações térmicas e químicas da proteína foram examinadas por monitoramento das mudanças nos espectros de CD e na fluorescência intrínseca da proteína renaturada. Os resultados indicam que a SBP permaneceu enovelada em uma extensão similar na presença ou ausência de 8 M de uréia ou de 6 M de GdnHCl. Do mesmo modo, foi razoavelmente estável em altas temperaturas. A alta estabilidade da proteína renaturada pode ser uma propriedade remanescente da SBP de seu parentesco evolucionário com as proteínas de armazenamento de sementes.

ABSTRACT

LUZ, Dirce Ferreira, D. S., Universidade Federal de Viçosa, June of 2006. **Heterologous expression and biochemical characterization of GmSBP2/S64 recombinant protein from soybean (*Glycine max*)**. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Maria Cristina Baracat Pereira and Marli Lourdes de Oliveira.

The sucrose binding protein (SBP) belongs to the cupin family of proteins and is structurally related to vicilin-like storage proteins. In this investigation, SBP was expressed in *E. coli* and large amounts of the protein accumulated in the insoluble fraction as aggregated, denatured protein. The refolding of the purified protein proceeded with a progressive removal of urea into the renaturation buffer, which contained an oxido shuffling system (2 mM reduced glutathione and 0.2 mM oxidized glutathione) and glycerol 5% (v/v) as a protein-stabilizing agent. The renaturation of the protein was assayed by using far-UV circular dichroism (CD), intrinsic fluorescence, and quenching by acrylamide, KCl and KI. The percentage of secondary structure of the renatured protein, which was calculated on the basis of the CD spectrum, was consistent with that obtained by theoretical modeling with a large predominance of beta-strand structure (42%) over the alfa-helix (9.9%). The fluorescence emission maximum of 303 nm for SBP indicated that the fluorescent tryptophan was completely buried within a highly hydrophobic environment. Nevertheless, tryptophan

quenching by acrylamide, KI and CsCL and the respective Stern-Volmer (K_{sv}) constant of $23.5 \pm 0.5 \text{ M}^{-1}$, $16.1 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}$ and $4.9 \pm 0.1 \text{ M}^{-1}$ indicate that the fluorescent tryptophan residues were quite accessible to the quenchers and hence exposed to the solvent. We also measured the equilibrium dissociation constant (K_d) of sucrose binding by fluorescence titration using the refolded protein. The low sucrose binding affinity ($K_d = 2.79 \pm 0.22 \text{ mM}$) of the renatured protein was similar to that of the native protein purified from soybean seeds. Collectively, our results indicate that the folded structure of the renatured protein is similar to the native SBP protein. As a member of the bicupin family of proteins which include highly stable seed storage proteins, it was of interest to determine the structural stability of SBP. The thermal and chemical denaturations of the protein were examined by monitoring changes in the CD spectra and in the intrinsic fluorescence of the renatured protein. Our results indicate that SBP remained folded to a similar extent in the presence or absence of 8 M urea or 6 M GdnHCl. Likewise, it was fairly stable to high temperatures. The high stability of the renatured protein may be a reminiscent property of SBP from its evolutionary relatedness to the seed storage proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas de armazenamento

As proteínas de armazenamento em sementes de plantas, além da grande importância econômica como fontes de nutrientes, têm impulsionado o desenvolvimento da biologia molecular de plantas por serem utilizadas como ferramentas em inúmeros ensaios bioquímico-biológicos.

A diversidade e, principalmente, a importância econômica de leguminosas e culturas de grãos têm levado ao intenso progresso no desenvolvimento de pesquisas sobre proteínas de armazenamento em sementes de grande número de gêneros. Essas proteínas se encontram empacotadas em corpos de armazenamento cotiledonários e representam a maior fonte de nitrogênio para o desenvolvimento das plantas (DOYLE et al., 1986). As proteínas de armazenamento em leguminosas são as globulinas – representadas pela fração 11 S não-glicosilada (leguminas) – e as proteínas 7S glicosiladas (vicilinas) (MILLERD, 1975; DERBYSHIRE et al., 1976; GIBBS et al., 1989). As globulinas são encontradas como complexos hexaméricos (coeficiente de sedimentação 11 S), sendo cada subunidade derivada de um complexo precursor que consiste de dois domínios, um N-terminal ácido constituído por uma cadeia α e um C-terminal básico constituído pela cadeia β , as quais permanecem associadas após o processamento proteolítico. As outras proteínas, as vicilinas, ocorrem como trímeros 7 S, com cada subunidade constituída de um polipeptídeo de 50 a

70 kDa, sendo sujeitas aos vários níveis de processamento (DUNWELL et al., 2000).

As proteínas 7 S da maioria das leguminosas consistem de combinações de subunidades produzindo uma massa molecular de aproximadamente 150-220 kDa (DERBYSSHIRE et al., 1976; GATEHOUSE et al., 1981; BLAGROVE et al., 1984). As subunidades de proteínas individuais variam em tamanho dentro e entre as espécies. As subunidades principais dessas proteínas do feijão-comum são α (51 - 53 kDa), β (47 - 48 kDa) e γ (43 - 46 kDa) (BROWN et al., 1981). Além da diferença em tamanho e falta de homologia antigênica entre essas proteínas (KLOZ; KLOZOVA, 1974; DOYLE et al., 1985), comparações da seqüência de nucleotídeos parciais dos genes e seus mRNAs têm mostrado uma variação considerável em homologia (LYCETT et al., 1983; SCHULER et al., 1983; CASEY et al., 1984). Entretanto, comparações de seqüência de aminoácidos têm revelado similaridades entre as vicilinas e as leguminas (ARGOS et al., 1985).

As proteínas faseolina do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), as proteínas β -conglucina de soja (*Glicine max*) e as canavalinas do feijão-de-corda (*Canavalina ensiformis*) pertencem às proteínas *vicilin-like* (DOYLE et al., 1986).

A faseolina é a maior proteína de armazenamento vacuolar encontrada nas sementes do feijão-comum (MUNTZ et al., 1998; NUTTALL et al., 2003). Ela é uma glicoproteína homotrimérica encontrada no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Monômeros de faseolina sintetizados interagem transientemente com o chaperone molecular residente no retículo endoplasmático BiP (NUTTALL et al., 2003). Sob condições de trimerização, a faseolina oligomérica dissocia-se de BiP e segue para o RE (VITALE et al., 1995), enquanto mutantes que permanecem monoméricos são retidos no lúmen do RE em associação com BiP até serem degradados pelo mecanismo de controle de qualidade do retículo (PEDRAZZINI et al., 1994, 1997). Os trímeros de faseolina possuem um sinal de localização vacuolar, um tetrapeptídeo AFVY no C terminal, e são, então, transportados do retículo endoplasmático para os vacúolos de armazenamento de proteínas via o complexo de Golgi (NUTTALL et al., 2003). Se a seqüência AFVY for eliminada por mutagênese, a proteína mutante é secretada quantitativamente para o apoplasto de folhas transgênicas de tabaco, onde ela é muito estável e se acumula em altos níveis (FRIGERIO et al., 1998).

Os trímeros de faseolina são associados por interações hidrofóbicas entre dois *clusters* de α -hélice (LAWRENCE et al., 1990, 1994), um localizado próximo ao centro da seqüência linear e outro próximo do C-terminal (FORESTI et al., 2003). A estrutura de cristal da faseolina revela que, no C-terminal, a região de α -hélice do monômero interage com a região central também de α -hélice para formação dos trímeros (FORESTI et al., 2003).

A canavalina é uma globulina solúvel presente nos extratos de semente de feijão-de-corda (*Jack bean*). É uma proteína muito similar estrutural e bioquimicamente à faseolina. Exceções são que a faseolina é glicosilada e composta de três subunidades altamente similares, enquanto a canavalina não possui nenhum carboidrato e parece ser composta de somente um único tipo de polipeptídeo (SMITH et al., 1982).

A canavalina é uma lectina de leguminosas, particularmente interessante em sua arquitetura e função (KO et al., 1993). A proteína é o representante clássico da alta homologia da classe das proteínas de armazenamento, as vicilinas das sementes de leguminosas (DERBYSHIRE et al., 1976; BEWLEY; BLACK, 1978; DOYLE et al., 1986; GIBBS et al., 1989). As canavalinas constituem a terceira maior fonte de proteínas na dieta, sendo de particular importância em países em desenvolvimento que não são supridos de proteína animal (CREAMER et al., 1988). Assim, pesquisas sistemáticas de aumento do valor nutricional dessa proteína, através de mutagênese sítio-dirigida, têm sido conduzidas (OXENDER; FOX, 1987). Além desse enfoque, destacam-se suas numerosas aplicações biológicas, dentre as quais se incluem suas utilizações na detecção da estrutura e da dinâmica de membranas celulares com tumores e produção de colunas de afinidade conA, à base de polissacarídeos, glicopeptídeos ou glicoproteínas (BITTIGER; SCHNEBLI, 1976; CHATTERJEE; MANDAL, 2003).

As canavalinas participam de vários processos de reconhecimento biológicos, ligando-se especificamente a carboidratos de superfície celular e a fatores solúveis provenientes de organismos envolvidos em infecções virais, bacterianas, de micoplasmas, além de fatores de crescimento e diferenciação celular (LIENER et al., 1986; SHARON; LIS, 1998; CHATTERJEE; MANDAL, 2003). As lectinas de plantas são o sistema-modelo para o estudo das bases moleculares para o fenômeno de reconhecimento por causa de sua ampla distribuição e fácil isolamento (SHARON, 1993) e por exibir ampla variedade de

especificidade por carboidratos, apesar da alta conservação de seqüência (SHARON; LIS, 1990).

As globulinas solúveis presentes no extrato de sementes de *Canavalia ensiformis* são representadas pela canavalina, ConA (concanavalina A), Con B (concanavalina B) e urease (SUMER, 1919). Todas já foram cristalizadas e analisadas por difração de raios X (SUMER, 1919, 1926; SUMER; HOWEL, 1936).

O monômero de lectina é constituído de três folhas β antiparalelas: seis folhas próximas planares ditas folhas “back”, sete folhas côncavas ditas folhas “front” e cinco folhas formando um “telhado” sobre as outras duas. Esta arquitetura dobrada “jelly roll” do monômero da canavalina é essencialmente conservada na família de lectinas de leguminosas (LORIS et al., 1998). Entretanto, as canavalinas são proteínas oligoméricas formando estruturas de dímero ou tetrâmero. As estruturas tetraméricas podem ser descritas como “dímeros de dímeros”, denominadas “dímero canônico”, que são caracterizadas por 12 folhas β , resultando no alinhamento lado a lado antiparalelo de seis folhas β “back” duplicadas. Dois dímeros canônicos semelhantes associam-se à parte central das suas folhas “back” de maneira perpendicular para formar o tetrâmero. Recentes dados estruturais demonstraram que há uma unidade monomérica essencialmente conservada que pode se oligomerizar (LORIS et al., 1998), e as lectinas freqüentemente diferem nas suas estruturas quaternárias, principalmente entre as lectinas tetraméricas de leguminosas, como a canavalina, as aglutininas de amendoim e as aglutininas de soja (CHATTERJEE et al., 2003).

A proteína β -conglucina é uma proteína de armazenamento dominante das sementes de soja, sendo a mais atrativa fonte alimentar encontrada nas plantas (FRIEDMAN; BRANDON, 2001; MARUYAMA et al., 2001, 2002). Exibe um efeito hipocolesterolêmico (CARROLL; KUROWSKA, 1995; SIRTORI et al., 1995) e possui boas propriedades nutricionais e físico-químicas (como formação de géis e habilidades emulsificantes requeridas para as indústrias alimentícias) (UTSUMI 1992; UTSUMI et al., 1997). As proteínas presentes nas sementes de soja são representadas por dois componentes: a β -conglucina (*vicilin-like*) e as glicininas (*legumin-like*), que correspondem a aproximadamente 30 e 40% do total das proteínas dessa semente, respectivamente, sendo esses dois componentes responsáveis pelas

propriedades nutricionais, físico-químicas e fisiológicas das proteínas de soja (UTSUMI, 1992; UTSUMI et al., 1997; MARUYAMA et al., 2001).

A β -conglícinina possui uma estrutura trimérica análoga às outras globulinas 7S, faseolina e canavalina (SHEWRY et al., 1995; UTSUMI et al., 1997), em que as subunidades do trímero são compostas por dois domínios similares. Cada domínio é composto de um β barril seguido por uma região de α hélice, representados pelo modelo canônico (LAWRENCE et al., 1994). O trímero possui massa molecular de 150-200 kDa, com três unidades identificadas: α , α' e β (THANH; SHIBASAKI, 1978) com massas moleculares variando entre 58-77, 58-83 e 42-53, respectivamente. Juntas, essas subunidades formam sete heterotrímeros com combinações ao acaso, como também três homotrímeros (MARUYAMA et al., 2004). As regiões do núcleo são altamente homólogas entre as três subunidades, e as subunidades α e α' possuem regiões de extensão no N-terminal, compostas de 125 e 141 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Outra diferença entre as subunidades consiste na organização dos carboidratos, em que dois grupamentos estão ligados às subunidades α e α' , enquanto somente um grupamento se encontra unido à subunidade β . As regiões do núcleo das três subunidades exibem alta homologia umas com as outras (90,4% entre α e α' , 76,2% entre α e β e 75,5% entre α' e β) (MARUYAMA et al., 1998, 2004). As regiões de extensão no N-terminal das subunidades α e α' exibem baixa homologia (57,3%) e alta propriedade acídica (MARUYAMA et al., 1998).

Muitas espécies moleculares da β -conglícinina contendo diferentes composições das subunidades, incluindo homo ou heterotrímeros, estão presentes nas sementes de soja (THANH; SHIBASAKI, 1976, 1978). As subunidades individuais diferem quanto às propriedades fisiológicas, físico-químicas e alergênicas. Por exemplo, a estabilidade térmica é uma das propriedades relevantes relacionadas ao processamento de alimentos, sendo conferida pelas regiões do núcleo da proteína β -conglícinina, as quais são em magnitude $\beta > \alpha' > \alpha$ (MARUYAMA et al., 1998). Além disso, somente a subunidade α' da β -conglícinina contribui para a auto-regulação dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (efeito hipocolesterolêmico) (SIRTORI et al., 1995; LOVATI et al., 1998), e somente a subunidade α da β -conglícinina foi identificada por ter uma reatividade com o soro de pacientes sensíveis à soja.

1.2. Transporte de sacarose

O entendimento do processo pelo qual as plantas usam suas proteínas de armazenamento durante o crescimento e desenvolvimento da plântula é de suma importância por ser este um processo vital, sem o qual as plantas não podem se propagar (DOYLE et al., 1986). Para permitir o desenvolvimento e maturação, as plantas fixam carbono da atmosfera como carboidratos metabolizados (ALDAPE et al., 2003).

Nas plantas superiores, a sacarose é a forma predominantemente de fotoassimilados (carbono reduzido), que são transportados das folhas maduras (tecidos-fonte) para os tecidos-dreno, como sementes, brotos, flores, órgãos reprodutivos e raízes, via sistema vascular, durante a fotossíntese (FRÖMMER; SONNEWALD, 1995; STITT, 1996; LALONDE et al., 1999; CONTIM et al., 2003). A proteína carreadora responsável por esse transporte é bastante específica para a sacarose e é denominada Suc (GRIMES et al., 1992; RIPP et al., 1998).

Proteínas que especificamente se ligam a carboidratos podem depender do arranjo espacial dos grupos hidroxila para a especificidade do substrato. O reconhecimento de um grupo hidroxila particular pode ocorrer por pontes de hidrogênio entre sítios da cadeia de aminoácidos ou oxigênio da amida no polipeptídeo. Alternativamente, estereoisômeros podem ser discriminados por requerimento da ausência da hidroxila em uma posição do centro quiral.

Muitos açúcares têm a área de superfície livre de hidroxilas ou possuem os grupos hidroxilas intramolecularmente ligados ao hidrogênio e são, portanto, hidrofóbicos em caráter. Se há um núcleo hidrofóbico, em um sítio de ligação carboidrato-proteína, equilibrando a superfície hidrofóbica, isso pode eliminar as estereoconfigurações incompatíveis e opostas. Hitz e colaboradores (1986) produziram uma série de derivados de sacarose (CARD; HITZ, 1984; CARD et al., 1986) e testaram a ligação desses substratos alternativamente e vários fenilglicosídeos com a proteína carreadora de sacarose isolada de protoplastos de sementes de soja em desenvolvimento. Foi verificado que o transporte de substratos análogos à sacarose pode indicar que grande porção de reconhecimento do substrato ocorre mediante a proteína carreadora, por meio de interações hidrofóbicas da sacarose com o sítio de ligação da proteína, através de pontes de hidrogênio com um pequeno número de hidroxilas.

O transporte de sacarose célula a célula ocorre diretamente via plasmodesma (transporte simplástico) ou através da membrana plasmática mediado por proteínas carreadoras (transporte apoplástico) (LEMOINE, 2000; WILLIAMS et al., 2000). Transportadores de sacarose (SUT) desempenham papel central na translocação de sacarose. Membros da família SUT são caracterizados pela presença de 12 domínios de transmembrana arranjados em dois grupos com uma configuração de 6 α -hélices cada um, separados por um "loop" citoplasmático (MARGER et al., 1993; WILLIAMS et al., 2000). Os membros dessa família SUT são altamente substrato-específicos, sendo a maltose (um dímero de glicose) o único açúcar que compete com a sacarose pelo sítio de ligação ativo de muitos transportadores de sacarose (LEMOINE et al., 1999; WILLIAMS et al., 2000). Muitos desses transportadores têm mostrado mediar o transporte de sacarose através de um mecanismo de transporte acoplado a prótons (CONTIM et al., 2003). A proteína SUT 1 tem sido descrita como força próton-motora que direciona o simporte de sacarose. É um transportador de alta afinidade que medeia o carregamento do floema e o transporte a longa distância, um passo essencial para a localização de assimilados em muitas plantas (RIESMEIER et al., 1992; BÜRKLE et al., 1998). A SUT 4, o segundo membro dessa família de transportadores de sacarose, corresponde a um componente saturado com baixa afinidade/alta capacidade de assimilar a sacarose encontrada nas folhas (WEISE et al., 2000). O terceiro membro dessa família tem sido designado como SUT 2 (BARKER et al., 2000). A proteína SUT 2 localiza-se, juntamente com os transportadores de sacarose de alta e baixa afinidades, nos elementos de seiva. SUT 2 não desempenha atividade de transporte, e tem-se acreditado que age como um sensor que controla o fluxo de sacarose contra a membrana plasmática dos elementos de seiva por regulação da expressão e atividade de SUT 1 e SUT 4 (BARKER et al., 2000). Embora a família completa dos genes transportadores de sacarose de dada espécie não tenha sido identificada, os transportadores de sacarose fazem parte de uma grande família gênica, com pelo menos sete seqüências distintas que codificam para potenciais transportadores de sacarose e estão presentes no genoma de *Arabidopsis thaliana* (WILLIAMS et al., 2000; ELMER et al., 2003).

Estudos anteriores, com o intuito de identificar transportadores de sacarose, resultaram na identificação de uma proteína de ligação à sacarose (*sucrose binding protein*), S64, presente em cotilédones de soja (RIPP et al., 1988).

1.3. Proteína S64

Apesar da falta de similaridade entre S64 e outras proteínas de transporte de membrana, foi demonstrado que S64 está envolvida em processos fisiológicos dependentes da translocação de sacarose em plantas (RIPP et al., 1988), e várias evidências têm indicado que a proteína S64 é um componente do sistema de transporte de baixa afinidade em plantas (PIROVANI et al., 2002). A proteína S64 está localizada na membrana plasmática de células que são ativamente engajadas no transporte de sacarose, como as células do mesófilo de folhas jovens, as células companheiras do floema maduro e as células dos cotilédones em diferenciação (GRIMES et al., 1992; OVERVOORDE; GRIMES, 1994). Evidências diretas de S64 no transporte de sacarose foram obtidas com estudos de complementação, usando uma linhagem de levedura mutante deficiente em secretar a invertase, incapaz de crescer em meios contendo a sacarose como única fonte de carbono (OVERVOORDE et al., 1996; PIROVANI et al., 2002). A S64 mediou o transporte de sacarose em leveduras, em concentrações de sacarose acima de 30 mM, sendo relativamente insensível ao gradiente de pH na membrana (OVERVOORDE; GRIMES, 1994; OVERVOORDE et al., 1996). Entretanto, esses dados não permitem conciliar a aparente inconsistência que existe na ausência de um motivo estrutural transportador típico de proteínas de membrana em S64 (CONTIM et al., 2003).

Análises do cDNA codificando S64 e sua deduzida seqüência de aminoácidos indicaram que S64 contém um único domínio hidrofóbico no seu N-terminal, sendo uma proteína hidrofílica que não possui os segmentos hidrofóbicos de membrana tipicamente presentes em proteínas de transporte (GRIMES et al., 1992). Análises bioquímicas da topologia de S64 demonstraram que ela é fortemente associada com folhetos externos da membrana plasmática (OVERVOORDE; GRIMES, 1994).

Estudos de repressão de S64 em plantas de tabaco mostraram alguns dos fenótipos típicos causados pela inibição de translocação de sacarose (RIESMEIER et al., 1994; KÜHN et al., 1996), como acúmulo de carboidratos nas folhas-fonte, inibição de fotossíntese e crescimento atrofiado (PEDRA et al., 2000). Os níveis de S64 em linhagens de plantas transgênicas foram manipulados e correlacionaram-se com a eficiência do transporte de sacarose radioativo pelas células e alteração das atividades de clivagem da sacarose nos metabólitos de maneira compensatória. De fato, o acúmulo aumentado de S64 causou aumento na atividade da sintase de sacarose intracelular com um concomitante declínio na atividade de invertase na parede celular (DELÚ-FILHO et al., 2000).

Homólogos dos genes de S64 foram isolados de ervilha (número de acesso no GeneBank™ Y11207) e *Vicia faba* (número de acesso no GeneBank™ VFA292221). Em espinafre, um homólogo de S64 foi imunolocalizado na membrana plasmática dos elementos de seiva em folhas completamente expandidas, brotos e raízes (WARMBRODT et al., 1991), e um homólogo de S64 foi detectado na fração microssomal de folhas jovens de *Nicotiana tabacum* (PEDRA et al., 2000). Em soja, três genes S64 foram identificados, sendo que o primeiro, GmS641, codifica uma proteína de 62 kDa localizada primariamente na membrana plasmática das células companheiras (GRIMES et al., 1992), e os outros dois parecem constituir formas alélicas da isoforma S64, designada S64 ou SBP2 (PIROVANI et al., 2002; CONTIM et al., 2003), doravante nomeada neste trabalho como S64 recombinante ou renaturada.

A proteína S64 é um membro da família cupin, que inclui outras proteínas de armazenamento de plantas superiores (BAÜMLEIN et al., 1995).

1.4. Família CUPIN

A superfamília de proteínas cupin inclui proteínas diversas funcionalmente, evoluindo de bactérias e arqueobactérias para eucariotos, incluindo animais e plantas superiores (DUNWELL, 1998; DUNWELL; GANE, 1998). Desde pequenas enzimas, encontradas em microrganismos termófilos primitivos, até proteínas de plantas de grande valor medicinal e proteínas de

armazenamento em sementes, que compreendem a maior parte da dieta humana, fazem parte dessa superfamília (DUNWELL et al., 2000). O termo cupin (do latim “cupa”, pequeno barril) (DUNWELL, 1998) foi designado para um domínio estrutural identificado em uma superfamília de proteínas procarióticas e eucarióticas que incluem várias enzimas, como também fatores que se ligam a açúcares e outros componentes (DUNWELL, 1998; DUNWELL; GANE, 1998). Essa superfamília também inclui muitas proteínas de armazenamento de plantas superiores (BÄUMLEIN et al., 1995), como faseolina, canavalina, β -conglícinina e S64/SBP. A estrutura tridimensional dessas proteínas (KO et al., 1993; LAWRENCE et al., 1994), especificamente faseolina (LAWRENCE et al., 1994) e canavalina (KO et al., 1993), forneceu a base para a geração de um modelo por homologia (GANE et al., 1998) e permitiu o modelamento molecular da proteína germina do trigo (GANE et al., 1998) e uma não usual proteína de resistência à protease com atividade de oxidase oxalato (LANE et al., 1993), bem como as predições da estrutura da família cupin (ALLEN et al., 1985).

As proteínas faseolina e canavalina são muito semelhantes estruturalmente, e essa semelhança permitiu a formação de um modelo tridimensional canônico para as proteínas *vicilin-like* pertencentes à família cupin. Essas proteínas são triméricas, e cada monômero consiste de dois domínios estruturalmente similares, refletindo uma duplicação em série observada nos nucleotídeos e na seqüência de aminoácidos. Esses domínios em série são compostos por dois elementos estruturais: oito folhas em β barril, tendo uma topologia “swiss roll” e um “loop” estendido contendo várias α hélices curtas. Os trímeros são formados pela sobreposição da superfície hidrofóbica composta de cadeias laterais de um lado do domínio N-terminal e uma superfície hidrofóbica complementar no domínio C-terminal de monômeros vizinhos. Essas interações intramoleculares são estabilizadas por várias pontes salinas (OVERVOORDE et al., 1997). O alto grau de conservação estrutural entre essas proteínas é o resultado de várias forças evolucionárias, incluindo interações das subunidades que são requeridas para montagem da holoproteína, empacotamento dessas holoproteínas dentro de corpos protéicos,

tolerância à dessecação, tipo de caminho secretório e condições gerais para estabilidade e solubilidade (BLAGROVE et al., 1984; DOYLE et al., 1986).

A característica do domínio cupin compreende duas seqüências conservadas denominadas motivos (DUNWELL; GANE, 1998), um deles corresponde às fitas C e D, e o outro motivo corresponde às fitas G e H (Figura 1). Essas seqüências estão bem caracterizados na proteína de armazenamento de feijão, a faseolina (LAWRENCE et al., 1994). Entre esses dois motivos, há uma região com as fitas E e F que, usualmente, contém histidina, variando de 15 resíduos em algumas enzimas bacterianas para mais de 54 resíduos em algumas proteínas de armazenamento. O número exato de resíduos é uma característica diagnóstica de cada subclasse de proteínas. A outra característica diagnóstica são os possíveis arranjos das proteínas pertencentes a essa superfamília cupin, os quais compreendem de um a oito domínios, como nas proteínas *germin-like* (MEMBRÉ et al., 1997; CARTER et al., 1999) ou uma estrutura com dois domínios ou domínio duplicado, encontrada inicialmente nas proteínas de armazenamento, podendo ser consideradas como parte de uma pressão evolucionária de um único domínio, o precursor eucariótico (BÄUMLEIN et al., 1995).

A grande maioria das proteínas pertencentes à família cupin contém somente um domínio conservado no núcleo da proteína. As várias subclasses podem ser categorizadas não somente com base no intermotivo variável desse domínio, mas também com base em resíduos conservados específicos dentro de cada motivo e, em menor extensão, dentro da região intermotivo. Em muitos casos, o primeiro motivo compreende 20 a 21 resíduos, e o segundo tem 16 resíduos. O espaçamento mínimo intermotivo encontrado nas cupin são 15 resíduos, que incluem as fitas E e F e o *loop* entre esses padrões, encontrado em fosfomanose isomerase. As proteínas de armazenamento de sementes com dois domínios cupin são essencialmente encontradas em proteínas de armazenamento em sementes, como a canavalina e a faseolina. Muitas proteínas de armazenamento ou apresentam falta de qualquer um dos resíduos de histidina conservados ou contêm uma única histidina conservada no motivo 1. Assim, essas proteínas não se ligam a metais e não apresentam nenhuma atividade enzimática (DUNWELL et al., 2000).

Figura 1 – Múltiplo alinhamento de proteínas representantes da família cupin. O alinhamento mostra os dois motivos conservados (em amarelo) e os resíduos altamente conservados em vermelho. O motivo 1 corresponde às fitas C e D e o motivo 2, às fitas G e H. O espaçamento intermotivos variável de 15 a 54 aminoácidos está representado. Os resíduos conservados nas fitas E e F estão mostrados em cinza. Em todos os casos, as seqüências são contínuas, e o espaçamento foi inserido somente para alinhar os dois motivos. O organismo-padrão e o número no genBank (gi) identificado das duas seqüências são: 1, *Desulfurococcus* sp. (1545809); 2, *Pyrococcus horikoshii* (3256943); 3, *Methanococcus jannaschii* (2128971); 4, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (2621410); 5, *Haloferax* sp. Linhagem D1227 (3293533b); 6, *Streptomyces coelicolor* (5457273); 7, *Streptococcus pyogenes* (contig 7); 8, *S. pyogenes* (contig 112); 9, *Mycobacterium tuberculosis* (2104394); 10, *Pseudomonas aeruginosa* (3510759); 11, *P. horikoshii* (3131181); 12, *Synechococcus* sp. (79640); 13, *Rhizobium* sp. (2499713); 14, *S. coelicolor* (4467248); 15, *S. halstedii* (730725); 16, *Bacillus subtilis* (2636545a); 17, *Aquifex aeolocus* (2984227); 18, *B. subtilis* (2636545b); 19, *A. aeolicus* (2983162); 20, *Escherichia coli* (116101); 21, *Enterobacter aerogenes* (1572541); 22, *P. horikoshii* (3256432); 23, *M. jannaschii* (2833572); 24, *Pseudomonas* sp. Linhagem U2 (4220433a); 25, *Sphingomonas* sp. Linhagem RW5 (3550667a); 26, *Arabidopsis thaliana* 91169199); 27, *Haloferax* sp. Linhagem D1227 (3293534a); 28, *Nocardioides* sp. (2588983a); 29, *Erwinia chrysanthemi* (1772621); 30, *Canavalia ensiformis* 917977a); 31, *Posum sativum* (2765097a); 32, *Glycine max* (548900a); 33, *Matteucica struthiopteris* (1019792a); 34, *Arachis hypogaya* (1168390a); 35, *A. aeolicus* (2984230); 36, *P.aeruginosa* (contig 54); 37, *B. subtilis* (2633733); 38, *Oryza sativa* (2952338); 39, *H.sapiens* (3201599); 40, *A. thaliana* (2739365); 41, *Ostertagia ostertagi* (2996183); 42, *Candida albicans* (Con4-2749); 43, *Saccharomyces cerevisiae* (2997115); 44, *Caenorhabditis elegans* (3877049); 45, *Collybia velutipes* (1604990a); 46, *B. subilllis* (2634260a); 47, *Synechocystis* linhagem PCC6803 (1652630a); 48, *Pyrococcus horikoshii* (3258400); 49, *Synechocystis* linhagem PCC6803 (1652630b); 50, *B. subilllis* (2634260b); 51, *C. velutipes* (1604990b); 52, *Pinus caribara* (274548); 53, *Phsarum polycephalum* (134860); 54, *M. struthiopteris* (1019792b); 55, *Triticum arstivum* (121129); 56, *B. subilllis* (2635598); 57, *A. thaliana* (461453); 58, *Phaseolus vulgaris* (230247a); 59, *P. vulgaris* (230247b); 60, *Synechocystis* PCC6803 (1653678); 61, *Canavalia gladiata* (18007b); 62, *P. sativum* (2765097b); 63, *G. max* (548900b); 64, *E. coli* (1787373); 65, *Haemophilus influenzae* (1175655); 66, *C. elegans* (2047349); 67, *A. hypogaea* (1168390b); e 68, *B. subtilis* (2636534). Os números (de 1 a 68) seguidos das letras (a, b ou e) referem-se ao organismo como arqueu, eubactéria ou eucarioto, respectivamente. Os sufixos a e b nas identificações gi identificados acima se referem ao primeiro ou segundo domínio na seqüência bicupin.

Seqüência

Motivo 1

Motivo 2

1a	QQT VKKHYHLHQYELFYIMG	EARLGIQE	TGYIARP	SDI FIVKPKTWHWVIA
2a	KSKVGHYHKFOYELFYIVG	EAKLGIQS	EYFLARP	SDI FLVKPQGVHWVEN
3a	QSKTLLKHHTSEELYYILEG	RGLMTLON	EKFVKK	SDI YIPKTPKHIEN
4a	QASKPHRLREBVEYYIMFG	EATMHO	ESFTVKE	SDI HIPSQAVQYIEN
5a	QESTDRFHNAVDAYFYVIG	QATHYGD	DVLEWBER	SDI FVPPDEIHHDDP
6a	AGTDSBQKPAQDLYFYVYVIG	RAIYVGM	ETTOVAR	SDI SVVYVPAQVAHKPHH
7a	KQONIGRHSPPQANVTI	GLASITIQ	ETVYVAE	SDI YMPAGI PHALTA
8a	QGESISQETSPPROKVLVLEGG	QLIFDLED	OKQVLTQ	SDI LAIPAQKWHLEA
9a	GAETVWRLQATOEIYFVL	GRGLVSYGD	ESGEVGF	SDI AYWPAGVQKI
10a	KRRLSLOMHHHRSEHWV	VMALVENGE	REFLINT	SDI NSTFPAQSHRLESN
11a	KRLSLOIHYHRSEHWV	VROTAKVKVGD	KFLLRP	SDI ESTFPAQVPHRLESN
12a	QQQISLQRHQQRQEHWV	VQQLARVQLGD	ROFSLRV	SDI QELDAIQEWHRLESN
13a	QKMLSLKRFHRSRHWV	QVGTAEVTL	RVTLIEN	SDI GSIYIPGGAHRLESN
14a	ADDAKPHWHNSAEHFFL	DGAADVLSGD	EVLTAGP	SDI LVPVPGKPHAFAA
15a	GERISEHYRPSSEFYVYVIG	AFEVLDGD	YFPHLRT	SDI QLLPKDVRHRFPAN
16a	GDAPFLVHKQTHQILV	LGKLELTDG	ERYLIS	SDI YANPAGTPSYRM
17a	KTSSEVPHYHSHOLTFT	VLLKKGELVLEGG	EKKLKE	SDI WAFPKQAVHFRH
18a	QDRIVDHYEYHTTFYQ	EGQMTMTDGD	QELQNP	SDI FLHYPANTHNSYLI
19a	QTYYPHTHPDREIRWV	LEGEVVI	KEFVKE	SDI GMLSEPNTPHWAKT
20a	ESIQLHQHXYEFTLV	LGRYFDEI	KRVLLR	SDI GDFVFLGSHHQSPY
21a	GGI NRRHYRPA	AVTFYVLS	SPVTLKP	SDI DGLLVPAGTTHSHWN
22a	GGELPHHQDW	ENEIFYVK	GNWFKV	SDI VPPSEVYIPNPEPHQYKN
23a	QEQMPKHYGNS	VNHLIIG	Q	SDI SPHNYKE
24a	QEWAPS	RHTPNAVIMV	EGDAYTV	SDI G
25a	QEVAP	CHHTQCALRFI	EGDAYTAVD	SDI G
26a	QEVYPA	HHTFGHDLVVI	KKKSVMNLS	SDI G
27a	QETAPA	RHGA	NALRFTI	SDI G
28a	QEVCS	RHTMSAYRFVTK	HPDAFTAV	SDI G
29a	QQAEPHYHYVYETA	YVLEKRI	ETRYGT	SDI DLS
30a	NTLLPHHSBDDLL	LVLEGGDAI	LVELVN	SDI PGG
31a	NALSPHYDB	EALFNK	KRBI	GLVA
32a	HTVSRHFD	EVVFFNI	KRAVGLYS	SDI G
33a	KALLIQY	DAQDLFLV	NEGRGOLSWE	SDI G
34a	NTLV	LKHADA	DNILVIGQ	QATVTYAN
35a	QKFLKE	THSDREYRYPVY	GGVFFLHP	SDI G
36a	AKFLRE	HHQDEYVAFY	AGRLFVLI	SDI G
37a	ENIKRE	HHHTDDEVRFI	VSHQIFVI	Q
38a	KSPFEE	LHLD	EIRYD	EGSYFVDR
39a	KIFYLE	LHLD	AKIQY	PDRS
40a	KMIFEE	LHLD	EIRYD	AGSYFVDR
41a	DELFEEN	HPEDQARMI	DOSAYD	VDR
42a	QIQYKE	HYHSD	EIRYI	AGSYFVDR
43a	ATFYQR	LHSD	EIRYD	AGSYFVDR
44a	DIFFEEL	HDD	AELRVI	KHVGFFDVRT
45a	GAIREL	HWKKA	AWAYV	LKOSTQISAYD
46a	QGVREL	HWKKA	AWAYM	LGRARI
47a	GAIREL	HWKKA	AWAYV	MGRTRI
48a	RTKGN	FAKCR	RAVYIA	KKGGML
49a	GANRQL	HWKKA	NADWY	LDSEMDL
50a	GANREL	HWKKA	NSDEW	YITGGRRMT
51a	GALREL	HWKKA	EDWTF	FI
52a	GBAIP	PHI	HPRGS	TI
53a	QAINL	PHI	HPRAT	EINFLAK
54a	QAVL	PHI	HPRAT	EIALVTK
55a	QTNPHI	HPRAT	EIQVMK	ELLVGL
56a	NKETTV	PHI	HPRAT	EIQVMK
57a	BETPI	PHI	HPRAT	EIQVMK
58a	EITLL	QADA	ELLVY	RSR
59a	GALFV	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
60a	VVRGL	HYIQ	ONPQKLV	RYVARG
61a	GALFV	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
62a	QBMSTI	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
63a	QBMSTI	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
64a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
65a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
66a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
67a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
68a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
69a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV
70a	QGVG	PHYSKAI	VLVN	EGAEHVELV

Fonte: Dunwell et al. (2000).

Predições da estrutura secundária e múltiplos alinhamentos de seqüência de aminoácidos (ARGOS et al., 1985) sugerem que similaridades estruturais existem entre as globulinas de armazenamento de sementes de soja, *vicilin-like* – as β -conglucinininas e *legumin-like* – as glicinininas, com coeficiente de sedimentação 7 S e 11 S, respectivamente. O trímero, que é o formador da subunidade precursora da globulina 11 S (MÜNTZ et al., 1993; NIELSEN et al., 1995), bem como parte da molécula trimérica da holoproteína madura hexamérica 11 S, aparenta ser estruturalmente similar à molécula trímica de globulina 7 S (DICKINSON et al., 1989). Análise de cristalografia de raios X de globulinas 7 S, como a canavalina (KO et al., 1993) e a faseolina (LAWRENCE et al., 1990, 1994), revelou que suas subunidades são compostas de dois domínios similares, propondo um modelo canônico para a estrutura das globulinas 7 S (LAWRENCE et al., 1994). Diferentes métodos de alinhamento de seqüências têm sido explorados para comparar os domínios das subunidades das globulinas 7 S com correspondentes regiões das subunidades das globulinas 11 S, indicando que domínios similares no N- e no C-terminal podem existir nas globulinas de armazenamento *legumin-like* (LAWRENCE et al., 1994; SHUTOV et al., 1995). Essas observações evidenciam que todos os quatro domínios estruturais, dois domínios 11 S e dois domínios das subunidades da globulina 7 S, são similares e podem ter evoluído de um único ancestral comum (SHUTOV et al., 1995). Esse modelo de evolução das proteínas de armazenamento é suportado por similaridades de domínios das globulinas de armazenamento, as proteínas germinas, envolvidas nos processos de dessecação/hidratação em sementes de plantas, e as esperulinas de esporos de fungos (BÄUMLEIN et al., 1995). De acordo com esse modelo (SHUTOV et al., 1995), baseado nas globulinas de armazenamento de sementes, a seqüência dos elementos *upstream* no β barril no domínio N-terminal e os elementos ligando os domínios N e o C terminal podem ter evoluído de um segmento no N-terminal de um ancestral comum de um único domínio *legumin/vicilin-like*. Similaridades estruturais entre essas duas globulinas foram propostas com base no padrão de proteólise limitada da glicinina e da β conglucininina (KAMATA et al., 1982; SHUTOV et al., 1996).

Cupins são encontradas em uma ampla gama de tipos celulares e possuem ampla variedade de funções bioquímicas, incluindo várias atividades enzimáticas relacionadas à síntese da parede celular, particularmente em reações envolvendo modificações de açúcares. Isso aparentemente pode ter uma associação consistente com resposta a estresses tanto em eucariotos quanto em procariotos. Em plantas superiores, essa associação com tolerância à dessecação (BÄUMLEIN et al., 1995) é exemplificada pelas proteínas de armazenamento de sementes. Muitas dessas proteínas são apoplásticas e associadas com resposta a estresses bióticos e abióticos, sendo, entretanto, de interesse primário para doenças de plantas visando à melhoria das culturas sobre condições limitantes. A resolução de membros da família cupin em nível atômico (LAWRENCE et al., 1994; NAKAGAWA et al., 1998; WOO et al., 1998) poderá confirmar a exata significância dos resíduos no sítio ativo e aqueles que conferirão a integridade molecular sob extremos de temperatura na presença de agentes químicos destrutivos. Tais informações poderão fornecer valores em potencial, aplicados na agricultura, medicina ou projetos ambientais, como também em projetos nutricionais que visam melhorar a qualidade das proteínas de semente.

Este trabalho teve como objetivos caracterizar a proteína S64 recombinante através de procedimentos envolvendo a análise comparativa deduzida da seqüência de aminoácidos da proteína S64; expressar a proteína S64 em *Escherichia coli*; e efetuar a purificação e renaturação, com conseqüente realização de técnicas espectroscópicas, como dicroísmo circular e fluorescência, e de espalhamento dinâmico de luz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A purificação e a renaturação da proteína S64 recombinante foram realizadas no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, e os demais experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, SP.

2.1. Reagentes

Triptona, extrato de levedura, glicerol, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Tris-base, ampicilina, lactose, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), sulfato de streptomicina, NaH_2PO_4 , cloreto de sódio (NaCl), imidazol, uréia, resina de nitrito tetracetato (Ni^{2+} NTA), ditioneitol (DTT), detergente não-iônico (NP40), glicerol, cloreto de magnésio (MgCl_2), sacarose, hidrocloreto de guanidina (Gdn-HCl), 8-anilino-1-naftaleno sulfonato de sódio (ANS), 4-4'-dianilino-1-1'-binaftil-5-5'-dissulfonato de potássio (Bis-ANS), citrato de sódio, acetato de sódio, cacodilato de sódio, 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazine ácido etanossulfônico (HEPES-Na), Tris-HCl, (3-ciclohexilamino)-1-ácido propanossulfônico (CAPS-Na), cloreto de césio (CsCl), acrilamida, iodeto de potássio (KI), guanidina tri-fosfato (GTP), duodecil sulfato de sódio (SDS), β -mercaptoetanol, azul-de-bromofenol, isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), meio LB, Tris-HCl, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), lisozima, triton X-100, Na_2PO_4 , imidazol, tiouréia, bezamidina,

glutaciona oxidada e glutaciona reduzida. Todos os reagentes utilizados foram de alta qualidade e adquiridos de empresas como SIGMA, MERCK, GIBCO, QIAGEN e outras.

2.2. Indução da proteína recombinante

Para obtenção da proteína S64 recombinante, contendo uma cauda de histidina (His6) na extremidade amino terminal, a linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3), [$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ gal dcm (DE3)], foi transformada com o plasmídeo pUFV120 (PIROVANI et al., 2002) contendo o cDNA do gene que codifica para a proteína S64 sem o peptídeo sinal.

Com a finalidade de obter a proteína S64 recombinante pura para os ensaios de cristalografia, uma colônia isolada das cepas para expressão foi inoculada num tubo de ensaio com 5 mL de meio de cultura TB (triptona 12 g L⁻¹, extrato de levedura 24 g L⁻¹, glicerol 4 mL L⁻¹, KH₂PO₄ 0,17 M, K₂HPO₄ 0,72 M), contendo o antibiótico ampicilina 50 mg L⁻¹. As células foram crescidas a 30 °C e 200 RPM, por seis horas, aproximadamente. Em seguida, o pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer com 500 mL do mesmo meio de cultura, contendo ampicilina 50 mg L⁻¹ e lactose 10 mM, mantido a 30 °C e 200 RPM durante a noite (cerca de 16 horas).

As células foram coletadas por centrifugação (10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C) e, em seguida, ressuspensas em 5 mL de tampão A (NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-base 0,01 M e uréia 8 M, a pH 8,0) contendo PMSF 2 mM. As bactérias foram lisadas por sonicação em um sonicador "Sonics Vibra-cell" com três pulsos de 30 segundos, com uma amplitude de 40%. O DNA foi precipitado com sulfato de estreptomicina 2% (p/v) (30 minutos a 4 °C). O lisado bacteriano foi centrifugado a 43.000 x g durante uma hora a 4 °C, e o sobrenadante contendo a proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidinas foi utilizado nos processos de purificação para posteriores ensaios cristalográficos.

Adicionalmente, visando caracterizar bioquimicamente a proteína S64 recombinante, a indução da síntese da proteína recombinante foi realizada com IPTG 0,4 mM, em 10 L de meio de cultura, e conduzida conforme as

recomendações do *pET System Manual* (NOVAGEN). As células de *E. coli* transformadas com o cDNA da S64 recombinante sem o peptídeo sinal foram crescidas a 30 °C e 180 RPM, em meio LB contendo ampicilina 100 mg L⁻¹, até atingirem A₆₀₀ de 0,4 a 0,6, quando foram, então, submetidas à indução com IPTG 0,4 mmol L⁻¹, por quatro horas. Como controle, utilizou-se a estirpe de *E. coli* BL21(DE₃) não transformada. Para a extração das proteínas totais, 1 mL das células induzidas e não-induzidas foi centrifugado a 5.000 x g a 4 °C, e 4 mL foram centrifugados nas mesmas condições, para obtenção dos extratos protéicos solúvel e insolúvel, sendo a proteína recombinante purificada da fração insolúvel.

2.2.1. Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis

Para obtenção das frações protéicas totais, foi centrifugado 1 mL da cultura de células a 10.000 x g/1 min/4 °C, sendo o sobrenadante descartado e secado por inversão. As células foram ressuspensas em 100 µL de PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM e pH 7,4) e 100 µL do tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, 2% de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 5% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,001% de azul-de-bromofenol) com SDS (concentrado duas vezes). Posteriormente, as amostras foram sonicadas sobre o gelo em um equipamento *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), com amplitude entre 60 e 80, *timer* (zero) e *Pulser* (>6), por quatro tempos. Esses extratos de proteínas totais foram, então, aquecidos por três minutos a 100 °C, para desnaturar as proteínas, e posteriormente foram aplicados 30 µL no gel de poliacrilamida 12%, sendo revelados com *Comassie Brilliant Blue*.

Para a obtenção das frações solúvel e insolúvel, 4 mL de células foram centrifugados a 6.500 x g/15 minutos/4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet*, secado por inversão. O *pellet* foi ressuspendido em 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 8,0, EDTA 2 mmol L⁻¹), no *vortex*, e deixado no gelo. Foram adicionados aos 500 µL de suspensão de células lisozima 1 mg mL⁻¹ e Triton X-100 0,1% (v/v), incubando-se a 30 °C por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi transferido para o gelo, ultrasonicado quatro tempos e centrifugado a 12.000 x g/15 minutos/4 °C. O sobrenadante foi

transferido para outro microtubo (fração solúvel). O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL do tampão de amostra do gel desnaturante, SDS 1X, conforme descrito no *pET System Manual* (NOVAGEN), representando, então, a fração insolúvel. Todas as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE, na presença de β-mercaptoetanol, como descrito por Laemmli (1970).

2.2.2. Purificação da proteína recombinante

Nos ensaios de cristalografia, a purificação da proteína S64 recombinante foi feita por cromatografia de afinidade em coluna com metal imobilizado (IMAC), sendo níquel o metal utilizado. Esse processo ocorreu num equipamento FPLC ÄKTA (*Amesham Pharmacia Biotech*).

Nessa purificação, utilizou-se uma coluna *Chelating Superose* (Pharmacia), contendo 10 mL de resina NTA, que foi carregada com 50 mM de NiSO₄ para uso. A coluna foi equilibrada com tampão A (NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-base 0,01 M e uréia 8 M, a pH 8,0) e, após a injeção do extrato bacteriano, a coluna foi lavada com o tampão de eluição (NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-base 0,01 M e uréia 8 M, a pH 8,0), contendo um gradiente descontínuo de concentrações crescentes de imidazol (10, 20, 30, 50 e 100%, correspondentes às concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500 mM, respectivamente). A eluição foi monitorada por meio de um detector de UV a 280 nm.

As frações coletadas foram analisadas em géis de poliacrilamida, em condições desnaturantes. A proteína foi eluída da coluna com concentração de imidazol de 30 e 50%, concentrada e equilibrada em tampão Tris-HCl, 10 mM, a pH 8,0, usando-se filtros Amicon® Ultra-15, de acordo com as instruções do fabricante.

Paralelamente, com o intuito da caracterização bioquímica, a proteína S64 recombinante foi purificada em resina Ni²⁺NTA (Qiagen). A cultura de células crescidas foi centrifugada a 20.000 x g por 15 minutos e o precipitado, ressuspenso em 5 mL do tampão de lise desnaturante (Na₂PO₄ 50 mmol L⁻¹ pH 7,9, Tris 10 mM, imidazol 10 mmol L⁻¹, NaCl 0,3 mol L⁻¹, 8 M uréia) acrescido de lisozima, 1 mM, PMSF 1 mM, tiouréia e bezamidina.

O rompimento das células ocorreu mecanicamente por ultra-sonicação em *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (COLE PARMER), com os padrões

de *pulser* 5, amplitude 60/80, por 15 segundos, seguidos de centrifugação a 39.000 x *g* por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a purificação da proteína recombinante por batelada, seguindo-se basicamente as recomendações do fabricante (Qiagen) para proteínas insolúveis em resina Ni²⁺NTA. Primeiramente, foram adicionados 500 µL da resina para cada litro de cultura, sendo a resina previamente equilibrada com 500 µL do tampão de lise desnaturante descrito acima. A ligação da proteína recombinante à resina foi conduzida a 4 °C por duas horas em agitador rotatório. Após esse período, o sobrenadante foi retirado da resina por meio de centrifugação em centrífuga clínica a 6.000 x *g* por dois minutos, sendo a resina lavada cinco vezes com 10 mL de tampão de lavagem desnaturante (Na₂PO₄ 50 mmol L⁻¹ pH 7,9, Tris 10 mM, imidazol 60 mmol L⁻¹, NaCl 0,3 mol L⁻¹ e 8 M uréia). A proteína foi eluída com 500 µL de tampão de eluição também desnaturante (Na₂PO₄ 50 mmol L⁻¹ pH 7,9, Tris 10 mM, imidazol 250 mmol L⁻¹, NaCl 0,3 mol L⁻¹ e 8 M uréia) durante uma hora a 4 °C, em agitador rotatório por duas vezes, correspondentes à primeira e segunda eluições da proteína S64 recombinante.

2.2.3. Renaturação da proteína recombinante

A proteína S64 recombinante, purificada das duas formas e em condições desnaturantes, foi renaturada por diálise em membrana de 50 kDa contra 500 mL do tampão HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 250 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mM, glutathiona oxidada 0,2 mM, glutathiona reduzida 2 mM, glicerol 5% (v/v) e NP-40 0,1% (v/v), em concentrações decrescentes de uréia (7 M a 0 M), em intervalos de 1 M de uréia, por 45 minutos a 4 °C, para cada concentração de uréia. Após a renaturação, a proteína foi dialisada contra Tris-HCL 0,5 mM, pH 7,5.

2.3. Espalhamento dinâmico de luz

As medidas do espalhamento dinâmico de luz foram realizadas com um equipamento DynaPro-99-E-15 (Protein Solutions Inc.). A concentração de proteína utilizada foi de 0,56 mg mL⁻¹, em um volume final de 60,0 µL. Antes das medidas, a proteína foi centrifugada a 20.000 x *g*, durante uma hora a 4 °C. Foram coletados dados durante duas horas, em intervalos de 10 segundos, para permitir análise estatística confiável.

2.4. Espectroscopia de absorção

Os espectros de absorção foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Beckman DU640, usando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

2.4.1. Determinação da concentração de proteína S64 recombinante

A concentração de proteína foi determinada espectroscopicamente, utilizando-se a Lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon c l$$

sendo A a absorção, ε o coeficiente de extinção molar em $M^{-1} cm^{-1}$, c a concentração da proteína em M e l o caminho óptico, em cm.

O coeficiente de extinção molar a 280 nm é $32080 M^{-1} cm^{-1}$ e foi calculado com base no conteúdo de triptofanos e tirosinas da proteína (GILL; von HIPPEL, 1989). O cálculo foi realizado utilizando-se o programa ProtParam, acessível em: <<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>>.

2.4.2. Dicroísmo circular

As medidas de dicroísmo circular foram obtidas em um espectropolarímetro Jasco, modelo J-810, equipado com um controlador de temperatura *Peltier-Type Control System* PFD425S e um banho termostaticado. Os espectros foram coletados, usando-se cubetas de 0,1 e 1 cm de caminho óptico nas regiões do UV-distante (180-250 nm) e do UV-próximo (250-340 nm), respectivamente. A concentração de proteína foi de 0,12 e 1,16 mg mL⁻¹, nas regiões do UV-distante e do UV-próximo, respectivamente. Os espectros são o resultado da média de quatro leituras consecutivas. As medidas foram feitas em tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8,0. Os dados foram corrigidos pela contribuição do tampão e transformados em elipticidade molar por resíduo $[\theta]$, usando-se um peso médio do resíduo de 115 Da (ADLER et al., 1973).

2.4.3. Desnaturação térmica

Os experimentos de desnaturação térmica foram realizados aumentando a temperatura de 20 até 95 °C. Coletaram-se espectros de dicroísmo circular na região do UV-distante (180-260 nm) a cada cinco graus, aguardando cinco minutos para atingir o equilíbrio antes de coletar cada espectro.

2.4.4. Estimativa da estrutura secundária

O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado a partir dos espectros de dicroísmo circular na região do UV-distante, usando-se o programa CDNN (*CD Spectra Deconvolution*) (BOHM et al., 1992). Esse programa compara o espectro observado com um conjunto de proteínas de estruturas conhecidas e ajusta o conteúdo de estrutura secundária até obter o melhor ajuste. Também utiliza cinco componentes de estruturas secundárias (α -hélice, folha- β antiparalela, folha- β paralela, voltas- β e estrutura irregular).

2.5. Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Aminco BOWMAN séries 2. As fendas de excitação e emissão foram de 8 e 16 nm, respectivamente, sendo as medidas realizadas com uma cubeta de quartzo de 0,5 x 1 cm. A temperatura da amostra foi mantida constante a 25 °C, com um banho de água circulante. Todas as medidas foram conduzidas em tampão Tris-HCl 10 mM, a pH 8,0, sendo o efeito de filtro interno minimizado usando-se amostras com absorção menor de 0,05. Os espectros foram corrigidos pela contribuição do tampão.

2.5.1. Ligação à sacarose

A ligação da proteína purificada à sacarose foi medida por dicroísmo circular e por fluorescência.

Espectros de dicroísmo circular nas regiões do UV-distante e do UV-próximo foram medidos na ausência e presença de sacarose, sendo os dados corrigidos pela diluição e transformados em elipticidade molar por resíduo. A

concentração de proteína usada foi de 0,12 mg mL⁻¹ para UV-distante e 1,16 mg mL⁻¹ para UV-próximo, em tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8,0.

O efeito de apagamento de fluorescência intrínseca da proteína induzido pela ligação da sacarose foi utilizado para estimar a afinidade da ligação. A concentração da proteína foi de 58 µg mL⁻¹ em tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8,0. Adicionou-se sacarose (0-100 mM) à solução da proteína, e o espectro de emissão de fluorescência foi coletado. O comprimento de onda de excitação foi de 275 nm e a faixa do espectro coletado de 290, até 420 nm. Os dados foram corrigidos pela contribuição do tampão e pela diluição. O efeito de filtro interno foi corrigido pelo método gráfico de Mertens e Kägi (1979).

Os dados corrigidos foram ajustados a uma equação hiperbólica, usando-se uma regressão não-linear com o programa ORIGIN. Os cálculos foram realizados assumindo-se uma estequiometria 1:1.

$$Q = \frac{Q_{\text{Max}} [\text{Sacarose}]}{K_d + [\text{Sacarose}]}$$

sendo Q o apagamento de fluorescência em cada concentração de sacarose, Q_{MAX} o apagamento de fluorescência máximo e K_d a constante de dissociação.

2.6. Ligação de GTP

Soluções da proteína S64 renaturada (0,5 mg mL⁻¹) com concentrações conhecidas de GTP (10-200 µM) foram centrifugadas em tubos de policarbonato (8 × 34 mm) de 0,5 mL, em um rotor TLA-120.1, na ultracentrífuga TL-120 (Beckman) a 627.000 x g (120.000 rpm), durante 10 horas a 20 °C. Depois da centrifugação, a metade inferior do tubo continha a proteína em equilíbrio com o ligante livre, e a metade superior não continha proteína, comprovado em medidas sem ligante. Os 150 µL superiores foram retirados cuidadosamente e diluídos com tampão. O ligante livre foi medido espectroscopicamente e associado, calculado como a diferença entre o ligante total e o ligante livre (HOWLETT et al., 1978; MEDRANO et al., 1991).

A medida de absorção a 253 nm foi utilizada para dosar a concentração do GTP. Um coeficiente de extinção molar de 13.700 M⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado (<http://www.fermentas.com/catalog/nucleotides/gtp.htm>).

2.7. Apagamento de fluorescência intrínseca da proteína

O apagamento da fluorescência intrínseca da proteína foi determinado mediante o uso de apagadores de fluorescência conhecidos, acrilamida, iodeto de potássio e cloreto de cézio (EFTINK; GHIRON, 1976, 1977; LEHRER, 1971). O efeito de apagamento foi determinado pelas adições sucessivas do apagador e coletando a emissão de fluorescência da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas como explicado anteriormente. A concentração de proteína foi de $58 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.8 Desnaturação química

A proteína foi incubada em concentrações de 6,7 M de cloreto de guanidina e 7,6 M de uréia, durante 24 horas. O efeito desses agentes químicos sobre a estrutura da proteína foi determinado pelos efeitos sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 renaturada. Os espectros de fluorescência foram coletados como explicado anteriormente, e a concentração de proteína foi de $58 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.9. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a estrutura da proteína foi determinado pela fluorescência intrínseca da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas como explicado anteriormente, e a concentração de proteína foi de $58 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de pH utilizados foram 3,0 (ácido cítrico/citrato de sódio); 4,0 e 5,0 (ácido acético/acetato de sódio); 6,0 e 7,0 (cacodilato de sódio); 8,0 (HEPES-Na); 9,0 (Tris-HCl); e 10,0 e 11,0 (CAPS-Na).

2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS) foram feitos de acordo com o método de Laemmli (1970). Os extratos protéicos foram misturados com um volume de tampão de amostra e incubados a $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por cinco minutos, antes de serem aplicados nos géis de poliacrilamida 12%.

Para a visualização das proteínas, os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue* (FAIRBANKS, 1971).

2.11. Comparação de seqüências

A seqüência da proteína S64 recombinante foi comparada com outras proteínas depositadas no banco de dados de proteínas com estrutura tridimensional conhecida (*Protein Data Bank*). Para comparação, utilizou-se o programa BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990), acessível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>.

2.12. Alinhamento de seqüências

O alinhamento da seqüência da proteína S64 recombinante com suas homólogas, β -conglucina, canavalina e faseolina foi realizado utilizando-se o programa MultAlin (*Multiple Aligment*) – *Network Protein Sequence Analysis*. Acessível em: <<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>>.

2.13. Predição da estrutura secundária

A predição da estrutura secundária da proteína S64 recombinante foi realizada utilizando-se o programa PSIPRED (JONES, 1999; MCGUFFIN et al., 2000), acessível em: <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psiform.html>>. A seqüência do peptídeo sinal não foi utilizada na predição da estrutura secundária. Esse programa é uma rede neural que prediz a estrutura secundária de proteínas baseando-se em matrizes de posição específicas geradas pelo programa PSI-BLAST.

3. RESULTADOS

3.1. Expressão da proteína S64 recombinante e purificação da fração insolúvel

A indução da proteína S64 recombinante em *E. coli* BL21(DE3) foi realizada como descrito anteriormente, sendo os extratos protéicos obtidos analisados em SDS-PAGE (Figura 2).

O extrato insolúvel foi submetido à cromatografia de afinidade, em resina de níquel Ni²⁺NTA (Qiagen), para a retenção das proteínas recombinantes fusionadas à histidina. As proteínas foram purificadas em graus superiores a 95% de homogeneidade, aproximadamente, o que foi observado após a eletroforese SDS PAGE e a coloração do gel por *Coomassie* (Figura 3).

3.2. Análise da seqüência da proteína S64 recombinante

A seqüência da proteína S64 recombinante foi submetida a uma comparação com a seqüência de outras proteínas homólogas, com estruturas tridimensionais conhecidas e cujas seqüências já foram depositadas no banco de dados (*Protein Data Bank*).

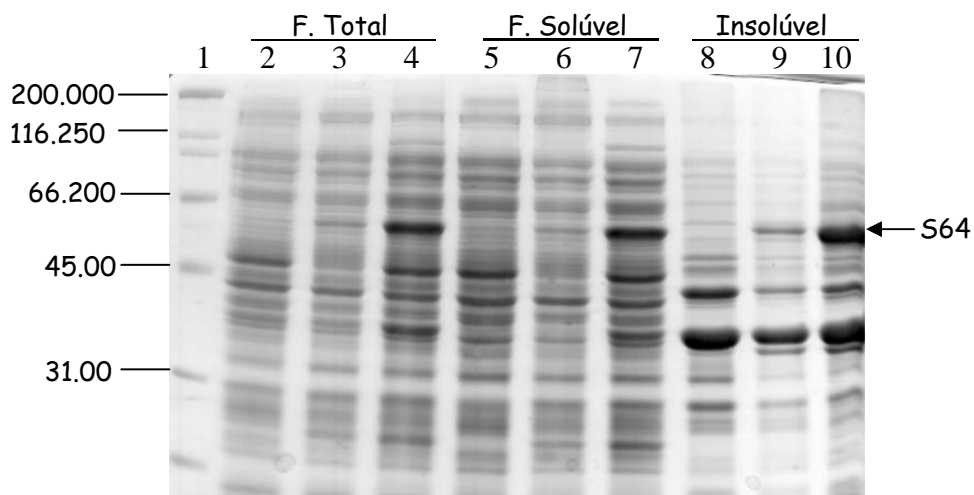


Figura 2 – **Análise em SDS/PAGE das proteínas celulares totais, solúveis e insolúveis de bactéria produzindo S64 recombinante.** Extratos de proteínas totais da bactéria BL21(DE3) (2), extratos de proteína totais da bactéria transformada na ausência do indutor IPTG (3) e na presença de IPTG (4) foram fracionados por SDS/PAGE e revelados com *Coomassie Brilliant Blue*. (5), (6) e (7) correspondem, respectivamente, ao fracionamento das proteínas solúveis do extrato celular da bactéria BL21(DE₃), da bactéria transformada na ausência do indutor IPTG e na presença de IPTG. (8), (9) e (10) correspondem, respectivamente, ao fracionamento das proteínas insolúveis do extrato celular da bactéria BL21(DE₃), da bactéria transformada na ausência do indutor IPTG e na presença de IPTG. O marcador de massa molecular corresponde a (1), expresso em Da.

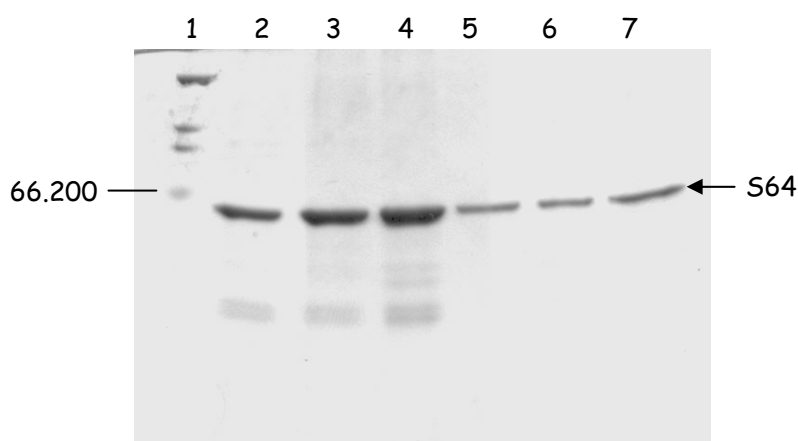


Figura 3 – **Análise em SDS/PAGE da purificação da proteína S64 recombinante em grande escala, em condições desnaturantes:** A canaleta 1 corresponde ao padrão de massa molecular em Da; 2, 3 e 4, à 1º eluição da proteína recombinante; e 5, 6 e 7, à 2º eluição, ambas da purificação de 3 L de cultura.

No alinhamento de seqüência da proteína S64 recombinante com as seqüências das proteínas homólogas, β -conglucina, canavalina e faseolina (Figura 4), verifica-se muita similaridade de seqüência entre essas proteínas de armazenamento, com exceção apenas de uma extensão de aminoácidos no N-terminal da proteína S64 recombinante, não encontrada nessas outras proteínas. Somente pequena extensão de aminoácidos no N-terminal está presente na seqüência da canavalina, mas ambas as seqüências da canavalina e S64 recombinante apresentaram muito pouca similaridade de seqüência.

3.3. Classificação da proteína S64 recombinante

Uma comparação da seqüência da proteína S64 recombinante no banco de dados de domínios conservados "CDD: *a Conserved Domain Database for protein classification*" (MARCHLER-BAUER et al., 2005) evidenciou a presença de dois domínios cupin (Figura 5A). Na Figura 5B é mostrado um alinhamento dos domínios cupin da proteína S64 recombinante com os representantes mais semelhantes destes, presentes no banco de dados de domínios conservados.

A estrutura tridimensional de duas proteínas de armazenamento pertencentes à família cupin, faseolina (LAWRENCE et al., 1994) e canavalina (KO et al., 1993), forneceram a base para a classificação dos membros desta família. Cada domínio possui dois grupos de seqüências altamente conservadas. Para a proteína S64 recombinante, que se enquadra nesse modelo, no domínio 1 verifica-se um padrão de 23 e 19 resíduos delimitando as folhas- β denominadas C e D e, no domínio 2, outro padrão de 19 e 11 resíduos, característicos das folhas- β G e H. Pode-se observar que o espaçamento entre os dois domínios é diferente em número de aminoácidos, podendo variar para mais de 50 resíduos, o que caracteriza cada subclasse de proteínas da família cupin (DUNWEL et al., 2000).

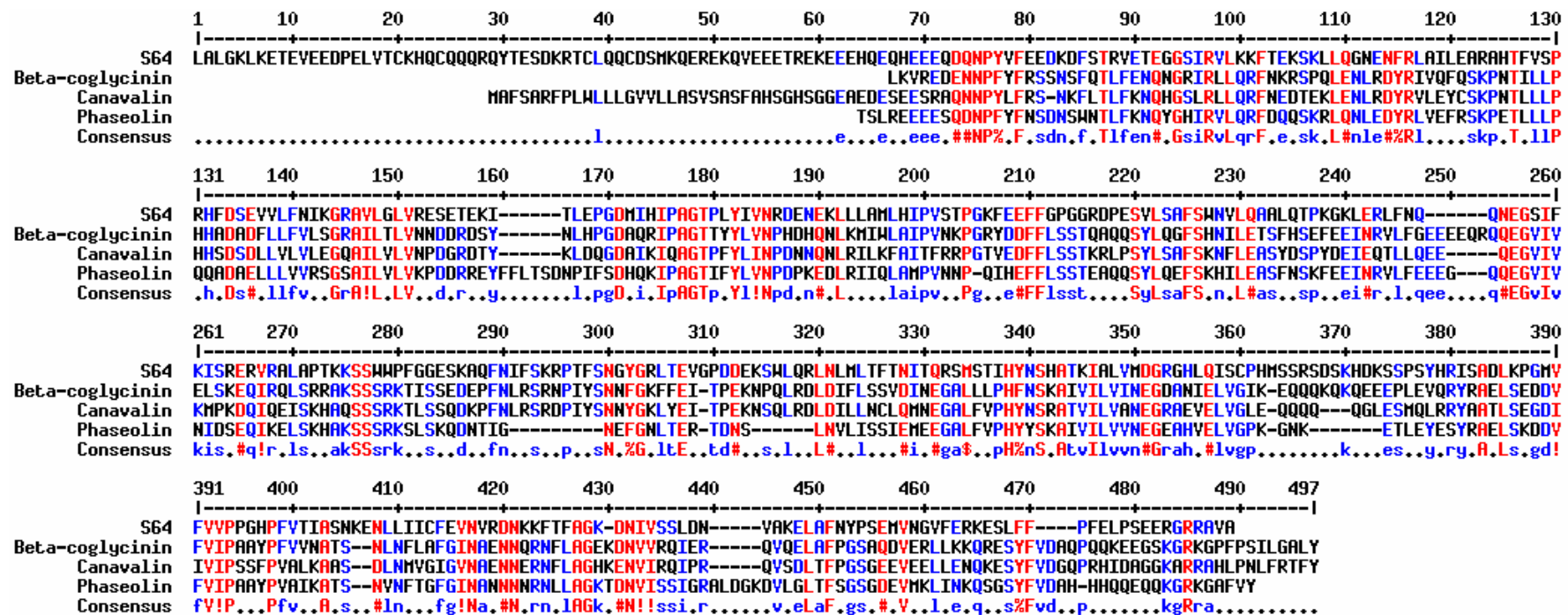


Figura 4 – Comparação das seqüências de resíduos de aminoácidos da proteína S64 recombinante com proteínas homólogas. Em vermelho são mostrados os resíduos de aminoácidos idênticos ou altamente conservados; em azul, os aminoácidos conservados; e em preto, os aminoácidos não-conservados. Verifica-se também a posição característica de cada aminoácido. O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o programa *MultAlin* (CORPET, 1988).

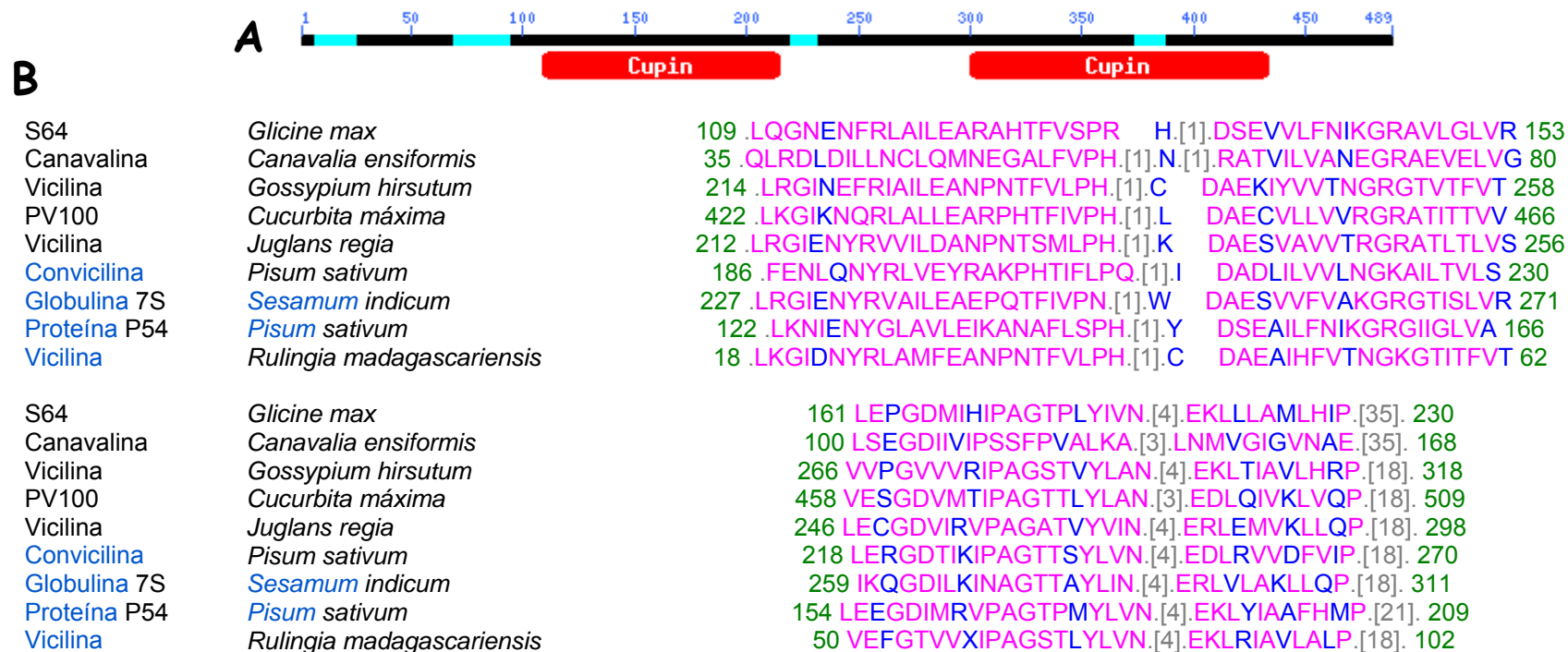


Figura 5 – **Representação esquemática da família cupin:** A) Gráfico demonstrativo dos dois domínios cupin. Em vermelho são mostrados esquematicamente os dois motivos cupin conservados na família. B) Alinhamento de seqüência no primeiro domínio conservado dos membros da família cupin. Nesse alinhamento é mostrada a grande similaridade de seqüência entre os motivos 1 e 2 das proteínas pertencentes à família cupin. Na parte superior da figura é apresentado o motivo 1, que possui 23 e 19 resíduos; na parte inferior, o motivo 2, que possui 19 e 11 resíduos. Esses resíduos são altamente conservados em ambos os domínios, 1 e 2, e o espaçamento entre eles é variável.

3.4. Predição de segmentos transmembrânicos

A predição de segmentos transmembrânicos foi feita através dos programas DAS (CSERZO et al., 1997) e *TMpred*, disponíveis na página da internet (www.expasy.ch). A saída gráfica dos programas não apresentou nenhuma região transmembrânica significativa de proteínas de membrana, não sendo também obtido nenhum segmento transmembrânico, a não ser um leve pico sobressalente, que corresponde aos aminoácidos de 193 a 198 (Figura 6A). Todos os outros aminoácidos da proteína apresentaram-se em uma região extramembranar, com características de proteínas com alta solubilidade.

De acordo com o programa *TMpred*, dois possíveis modelos foram considerados, usando somente segmentos transmembrânicos significativos. A proteína S64 recombinante não apresentou nenhuma característica de proteína transmembrânica, e nenhum possível modelo foi encontrado (Figura 6B).

3.5. Predição de estrutura secundária

Na Figura 7, mostra-se a predição dos elementos de estrutura secundária para a proteína S64 recombinante realizada utilizando o programa PSIPRED (JONES, 1999; McGUFFIN et al., 2000).

A proteína S64 recombinante apresentou uma proporção de 21% de α -hélices e 28% de folhas- β em relação aos 467 aminoácidos totais que constituem a proteína S64 recombinante. Esses elementos de estrutura secundária coincidem, em número e posição, com os elementos das proteínas homólogas a S64 recombinante, β -conglícinina, canavalina e faseolina, exceto para um conteúdo de 3 α -hélices (9%), que está presente na porção N-terminal da proteína S64 recombinante que não é encontrado nas outras proteínas homólogas.

A seqüência das estruturas de α -hélice e folhas- β está formando uma repetição em dois grupos, constituindo os dois domínios encontrados nos membros da família cupin, aumentando a confiabilidade dos dados.

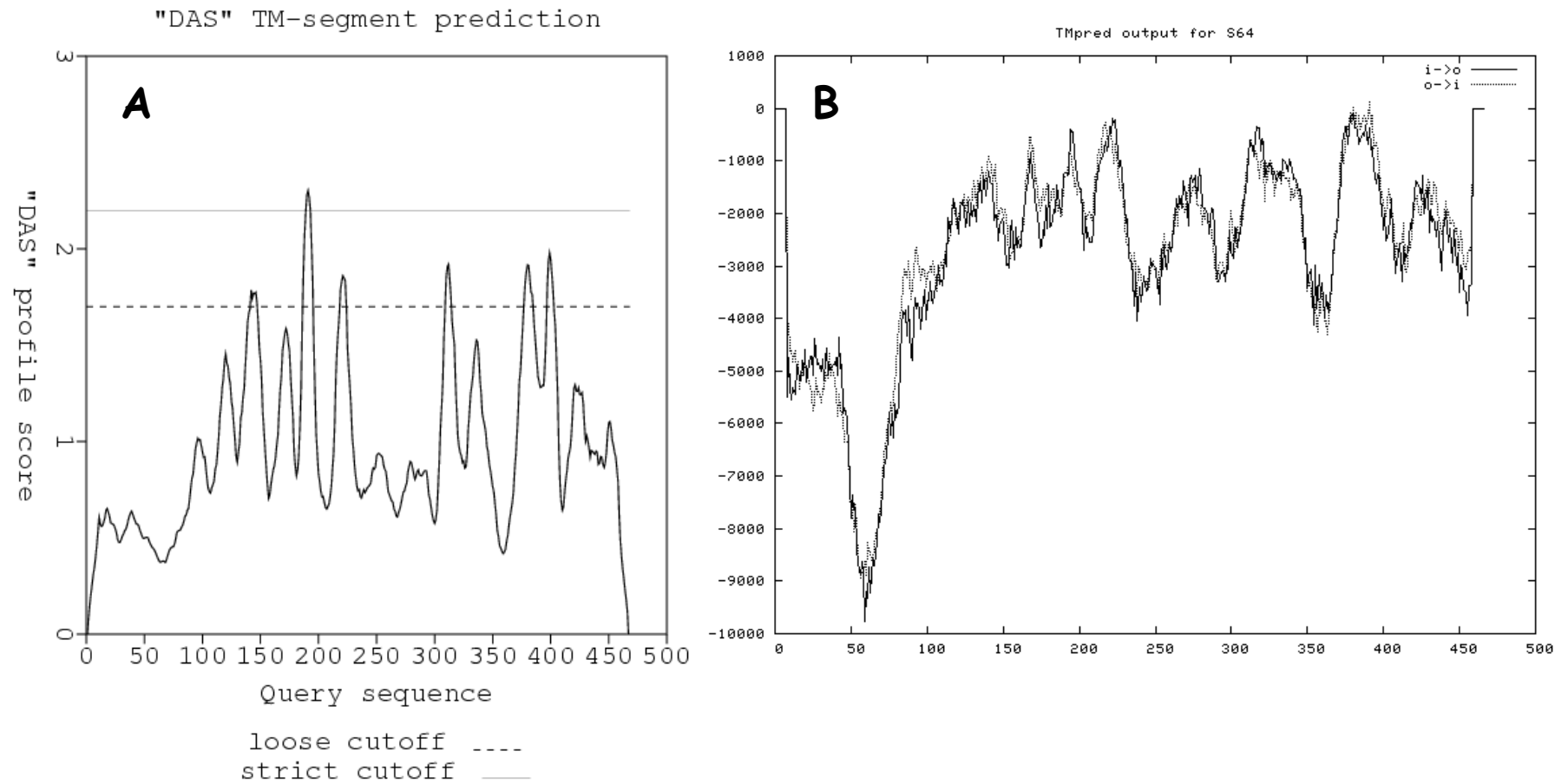


Figura 6 – **Predição de segmentos transmembrânicos da proteína S64 recombinante.** Os gráficos A e B mostram a hidrofobicidade em função da seqüência de aminoácidos. As regiões acima da linha cheia indicada em A, na horizontal, correspondem a prováveis segmentos transmembrânicos, os picos acima de 2,3 indicam prováveis regiões de membrana e, em B, essas regiões se referem aos picos acima de zero.

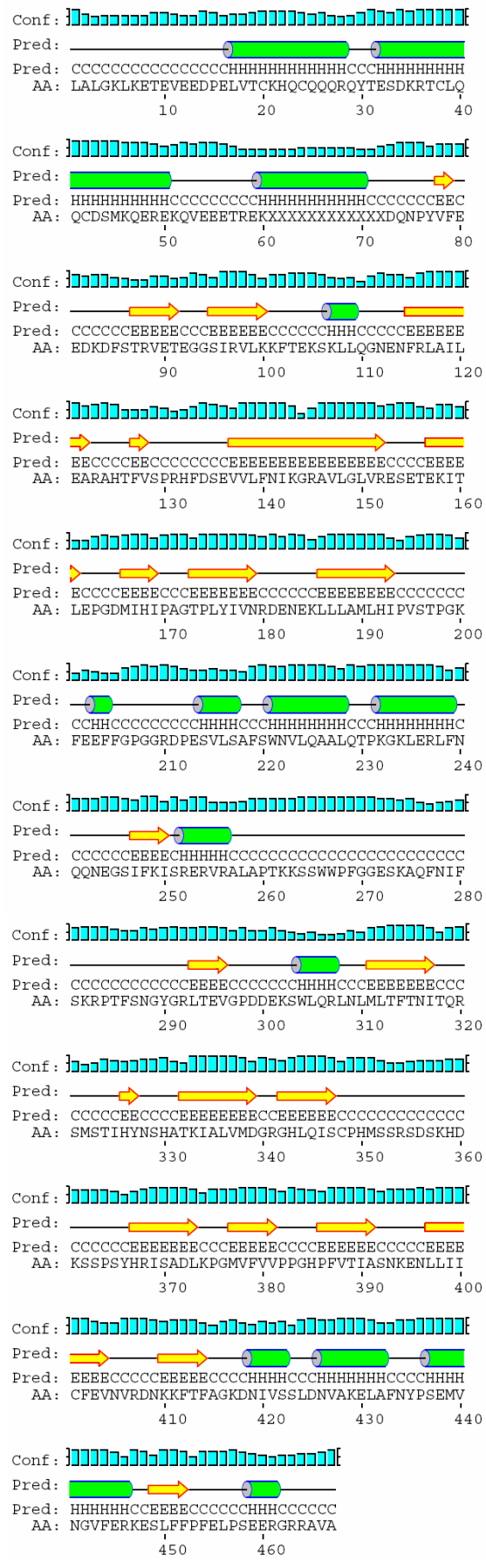


Figura 7 – Predição da estrutura secundária da proteína S64 recombinante, calculada pelo programa PSIPRED (JONES, 1999; McGUFFIN et al., 2000), em que os barris em verde se referem à estrutura de α hélices, as setas amarelas referem-se a folhas β , as linhas cheias entre essas estruturas são de random-coil e as barras azuis se referem à confiabilidade, ou seja, à precisão dos dados que o programa originou.

3.6. Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular da proteína S64 recombinante nas regiões UV-distante (Figura 8A) e UV-próximo (Figura 8B) evidenciaram que, na região do UV-distante, ocorre um mínimo a 204 nm e um ombro na região de 223-225 nm (Figura 8A). Na região do UV-próximo, o espectro de dicroísmo circular apresenta um mínimo ao redor de 263 nm. Essas características indicam que a proteína se encontra enovelada.

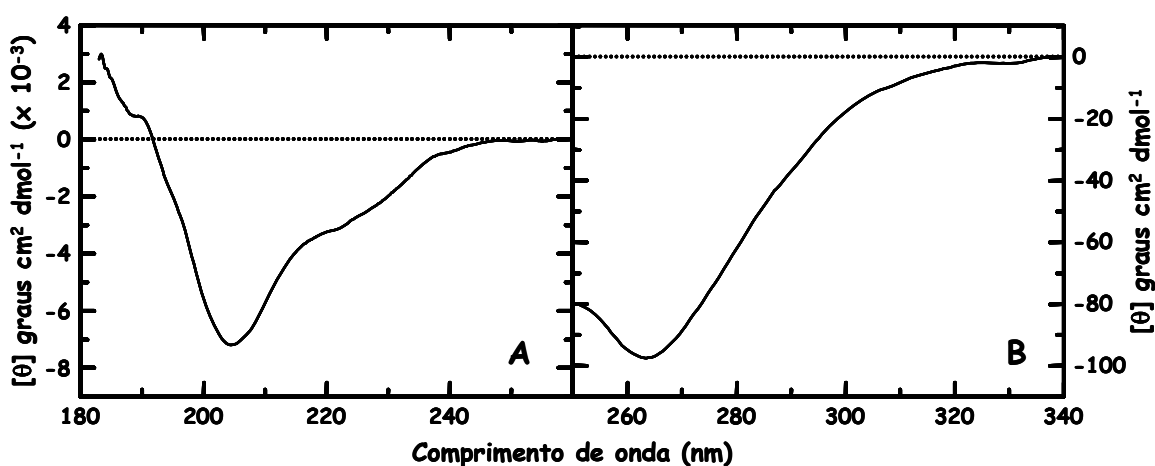


Figura 8 – **Espectros de dicroísmo circular da proteína S64 recombinante:**
A) Espectro na região do UV-distante e B) Espectro na região do UV-próximo.

A estimativa do conteúdo e tipo de estrutura secundária da proteína baseada no espectro de dicroísmo circular na região do UV-distante (Tabela 1) foi realizada com o programa CDNN (BOHM et al., 1992). O programa realiza o cálculo da estrutura secundária usando-se as informações provenientes de 33 proteínas com estrutura tridimensional conhecida.

Tabela 1 – Estimativa da estrutura secundária da proteína S64 recombinante

	185-260 nm
α -hélice	9,9 %
Folha- β antiparalela	38,6 %
Folha- β paralela	3,4 %
Volta- β	24,7 %
Estrutura desordenada	29,5 %
Soma total	106,1 %

3.7. Fluorescência

O espectro de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante é mostrado na Figura 9. O espectro de excitação (Figura 9, linha vermelha) possui um máximo a 275 nm e o espectro de emissão, um máximo a 303 nm (Figura 9, linha preta).

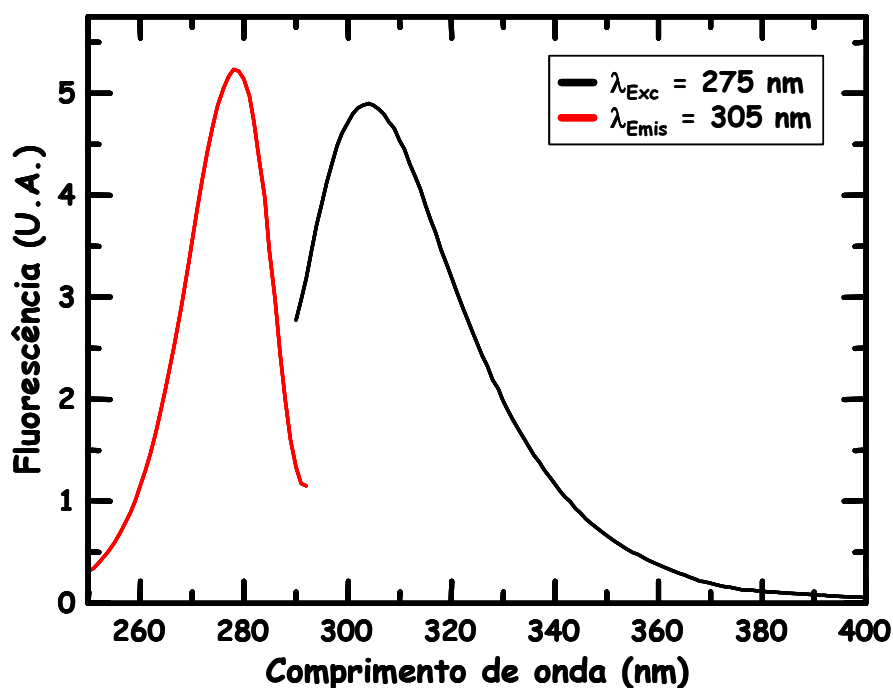


Figura 9 – Espectros de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante. Linha vermelha, espectro de excitação obtido com um comprimento de onda de emissão de 305 nm; e linha preta, espectro de emissão obtido com um comprimento de onda de excitação de 275 nm.

3.7.1. Apagamento de fluorescência

A avaliação do apagamento de fluorescência intrínseca das proteínas pela presença de apagadores conhecidos (acrilamida, cloreto de céσιο e iodeto de potássio) fornece informações sobre a acessibilidade e localização dos cromóforos da proteína.

Foram realizados estudos de apagamento de fluorescência com a proteína S64 recombinante com a molécula apolar acrilamida, capaz de certa penetração na proteína, com a molécula polar CsCl, carregada positivamente e com a molécula KI, carregada negativamente. O caráter dessas moléculas pode fornecer informações sobre o ambiente que rodeia os cromóforos da proteína.

Os dados de apagamento de fluorescência foram tratados de acordo com a equação Stern-Volmer (BIRKS, 1970):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q]$$

sendo F_0 a intensidade de fluorescência na ausência do apagador, F a intensidade de fluorescência na presença do apagador, K_{SV} a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ a concentração do agente apagador. A constante de Stern-Volmer, K_{SV} , é um parâmetro que fornece informação sobre a acessibilidade do fluoróforo ao agente apagador.

A Figura 10 ilustra o efeito da acrilamida sobre a fluorescência da proteína S64 recombinante. A adição de quantidades crescentes de acrilamida leva a um apagamento da fluorescência da proteína até quase o total desaparecimento a uma concentração de 118 mM (Figura 10A). O gráfico de Stern-Volmer (Figura 10B) mostra um gráfico não-linear, indicando a possível existência de várias populações de triptofanos, com acessibilidades diferentes ao apagador acrilamida. Esses dados podem ser tratados por meio de uma modificação da equação de Stern-Volmer (LEHRER, 1971). Nessa nova equação aparece um novo termo, f_a , que representa a fração acessível de fluoróforos ao apagador de fluorescência.

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_{SV} [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

Na Figura 10C é mostrado o gráfico de Ster-Volmer modificado. A constante de Stern-Volmer obtida para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante por acrilamida foi de $23,1 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$ e a fração de fluoróforos acessível, de $1,01 \pm 0,07$.

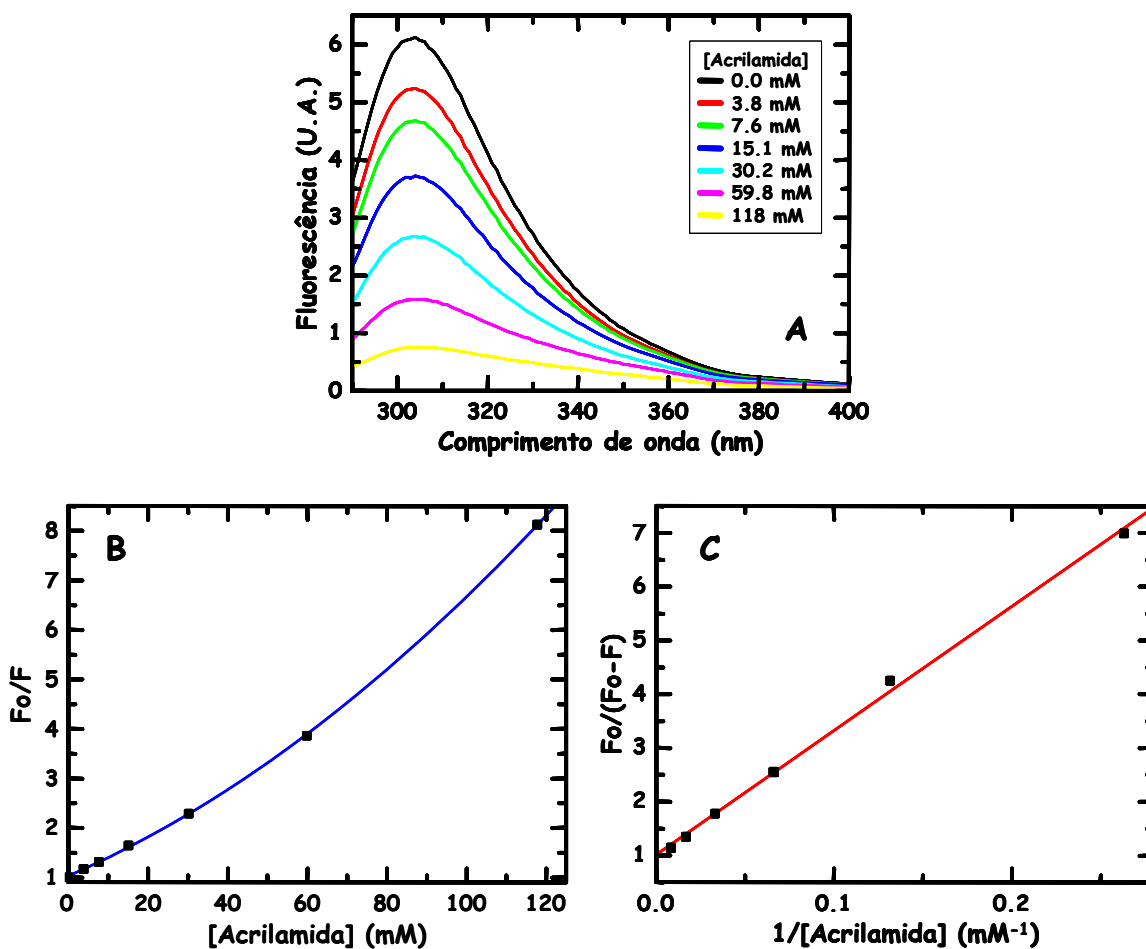


Figura 10 – **Efeito da acrilamida sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante:** A) Espectros de emissão da proteína S64 recombinante em ausência e em presença de acrilamida, cujas concentrações usadas estão indicadas. B) Gráfico de Stern-Volmer para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante produzido pela acrilamida. C) Gráfico de Stern-Volmer modificado para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante produzido pela acrilamida.

Na Figura 11 é mostrado o efeito do cloreto de césio sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante. O apagamento da fluorescência acontece em concentrações mais elevadas para essa molécula do que para a acrilamida e o iodeto de potássio (Figura 11A). O gráfico de Stern-Volmer (Figura 11B) apresenta uma dependência linear do apagamento da fluorescência com a concentração do CsCl, e a constante de Stern-Volmer calculada com esses dados foi de $4,9 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$.

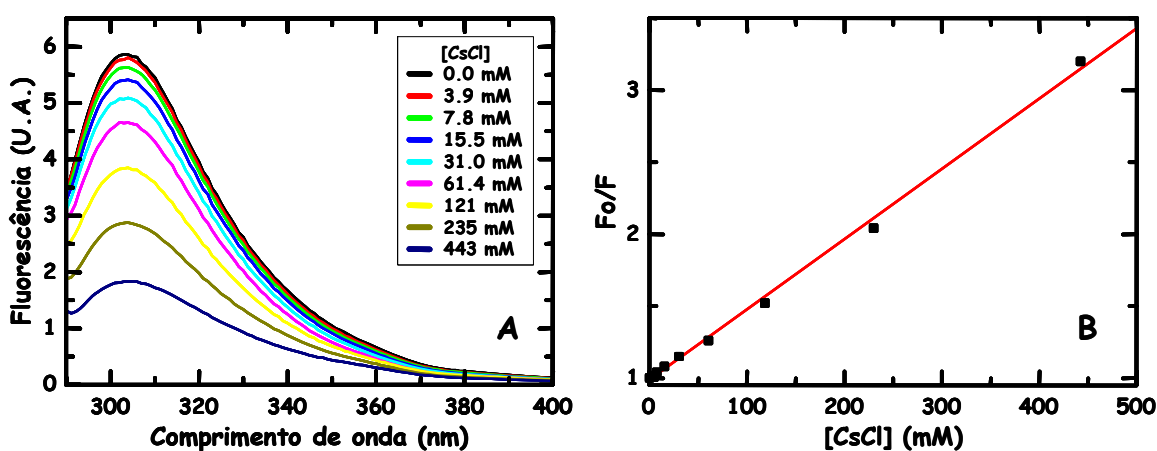


Figura 11 – **Efeito do cloreto de césio sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante:** A) Espectros de emissão da proteína S64 recombinante em ausência e presença de cloreto de césio, cujas concentrações estão indicadas. B) Gráfico de Stern-Volmer para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante produzido pelo cloreto de césio (CsCl).

Na Figura 12 é mostrado o efeito do iodeto de potássio sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante. O apagamento da fluorescência acontece em concentrações menores com essa molécula do que com o cloreto de césio (Figura 12A). O gráfico de Stern-Volmer (Figura 12B) apresenta uma dependência linear do apagamento da fluorescência com a concentração do CsCl, e a constante de Stern-Volmer calculada com esses dados foi de $16,1 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}$.

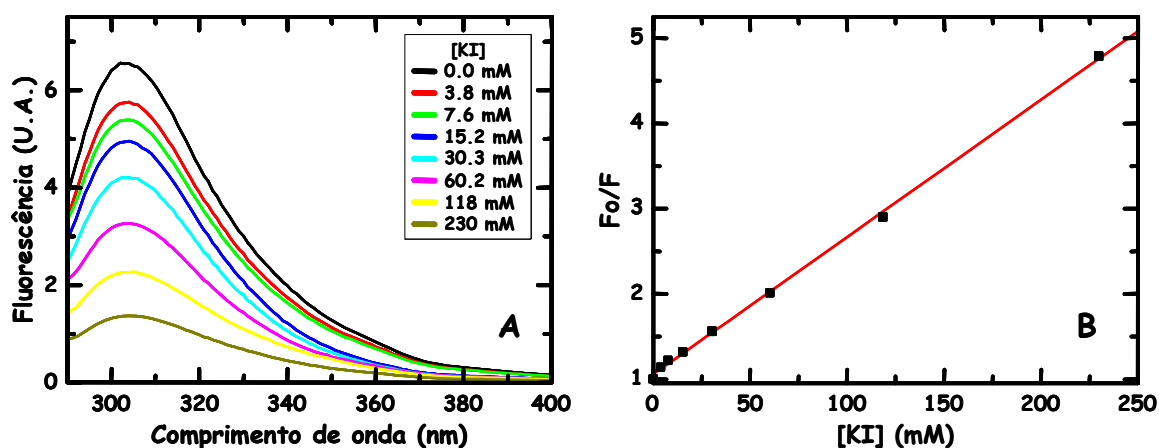


Figura 12 – Efeito do iodeto de potássio sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante: A) Espectros de emissão da proteína S64 recombinante em ausência e presença de iodeto de potássio, cujas concentrações estão indicadas. B) Gráfico de Stern-Volmer para o apagamento de fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante produzido pelo iodeto de potássio (KI).

3.8. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Com a finalidade de verificar se a proteína renaturada manteve sua capacidade de formar oligômeros, foi determinado o raio de giro da proteína S64 recombinante (Figura 13) por espalhamento dinâmico de luz. Pode-se observar um só pico com um raio de giro de 7,3 nm, correspondente a uma massa molecular de 351 kDa. Considerando uma massa molecular de 55 kDa para o monômero dessa proteína, pode-se dizer que, em solução, ela provavelmente se encontra na forma de hexâmero.

3.9. Efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca

Na Figura 14, é mostrado o efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante. Não existem mudanças significativas entre os valores de pH 4 e 8. Em valores de pH superiores a 8 e inferiores a 4, existe diminuição da fluorescência, podendo indicar exposição dos fluoróforos a um ambiente mais polar.

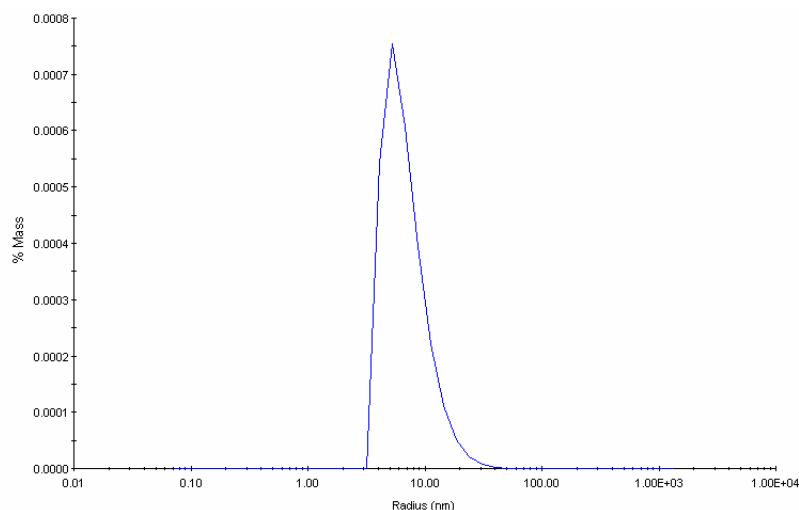


Figura 13 – Determinação do raio de giro da proteína S64 recombinante por espalhamento dinâmico de luz.

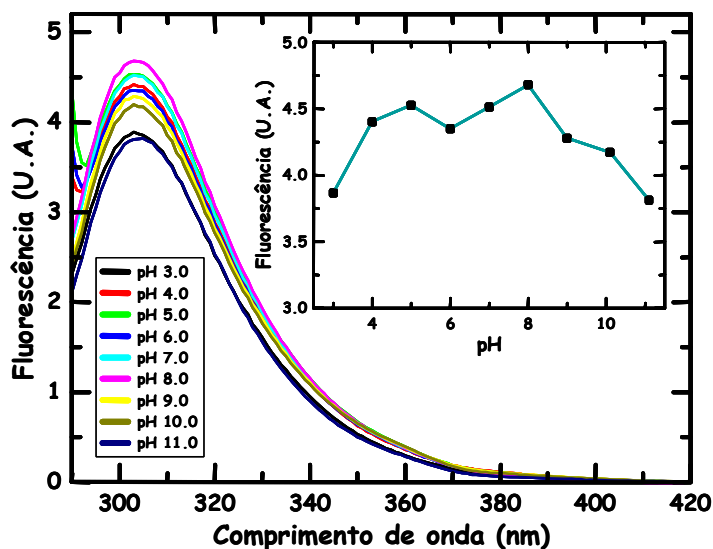


Figura 14 – Efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante. Espectros de fluorescência obtidos em diferentes pH, cujos valores estão indicados na figura, sendo o comprimento de onda de excitação de 275 nm. No gráfico menor, dentro da figura principal é mostrada a fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima (305 nm) perante o pH.

3.10. Estabilidade da proteína S64 recombinante

A estabilidade da proteína recombinante foi avaliada por meio de ensaios de desnaturação térmica e desnaturação química (Figuras 15 a 17). Nas Figuras 15 e 16, é mostrado o efeito da temperatura sobre o espectro de dicroísmo circular da proteína S64 recombinante. Com o aumento da temperatura, observa-se uma perda gradual na intensidade do mínimo a 204 nm. A 95 °C, esse mínimo se desloca ligeiramente para 202 nm. Essas mudanças são acompanhadas por uma redução do ombro a 223-225 nm (Figuras 15 e 16A).

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária a cada temperatura (Figura 16B) apontou pequena redução de α -hélices, voltas- β e estruturas desordenadas e pequeno aumento das folhas- β antiparalelas com a elevação da temperatura.

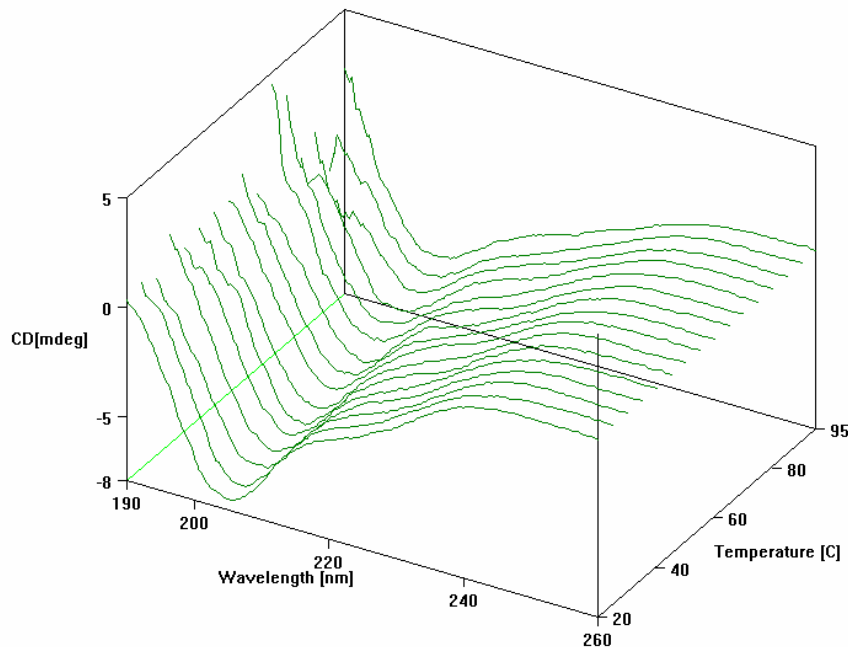


Figura 15 – **Efeito da temperatura sobre os espectros de dicroísmo circular da proteína S64 recombinante.** Os espectros foram coletados entre 20 e 95 °C e mostram uma visão em 3D, em que essas temperaturas não interferiram na desestabilização da proteína S64 recombinante.

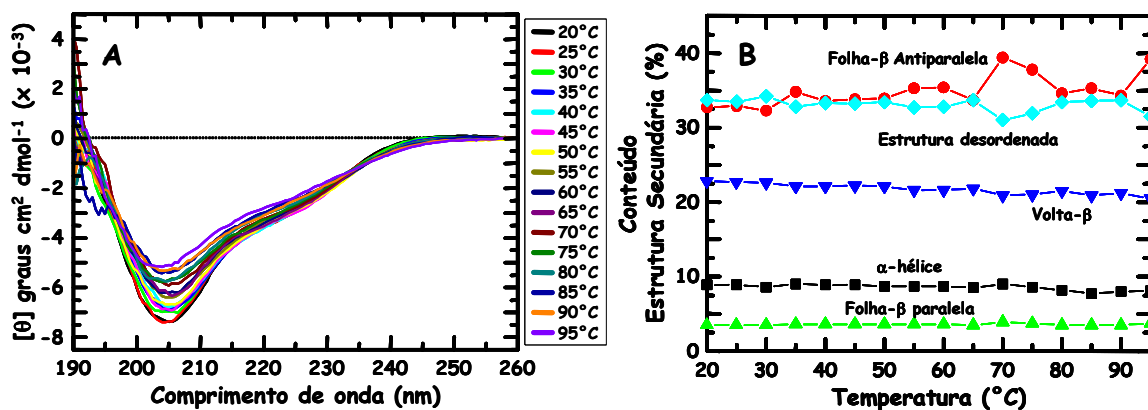


Figura 16 – Efeito da temperatura sobre os espectros de dicroísmo circular da proteína S64 recombinante: A) Os espectros de CD foram coletados em uma faixa de temperatura entre 20 e 95 °C em diferentes comprimentos de onda (190-260 nm, UV-distante). B) Informações sobre o conteúdo de estruturas secundárias em função da temperatura são fornecidas.

Na Figura 17 são mostrados os efeitos do cloreto de guanidina (6,7 M) e da uréia (7,6 M) sobre a fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante. O máximo de emissão da proteína pura (303 nm) é deslocado para comprimentos de onda maiores quando na presença desses agentes desnaturantes, sendo 305 e 307 nm para uréia e cloreto de guanidina, respectivamente.

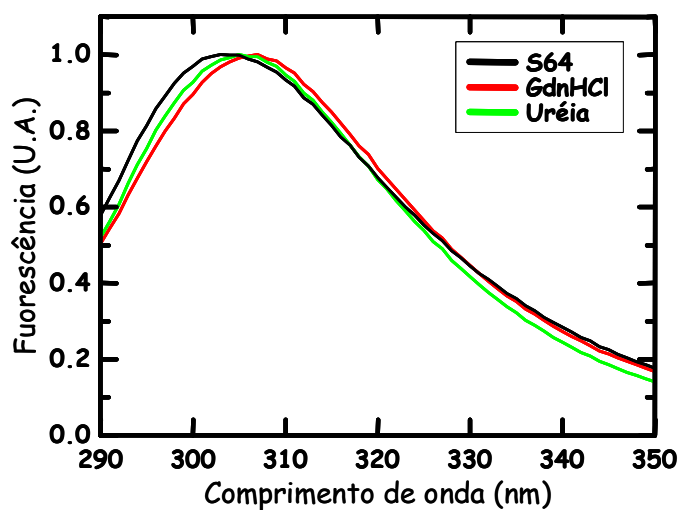


Figura 17 – Desnaturação química da proteína S64 recombinante. O gráfico mostra que os agentes desnaturantes mudaram o máximo de emissão da proteína S64 recombinante.

3.11. Ligação de ANS e Bis-ANS

Os compostos 8-anilino-1-naftaleno sulfonato (ANS) e 4-4'-dianilino-1,1'-binaftil-5-5'-dissulfonato (Bis-ANS) são sondas que, ao se ligarem a regiões hidrofóbicas das proteínas, aumentam de forma significativa sua fluorescência (LADOKHIN, 2000). Quando o ANS foi adicionado a uma solução da proteína S64 recombinante, obteve-se um aumento da sua fluorescência bem pequeno (Figura 18A) e saturável em concentrações superiores a 50 μM . Quando o Bis-ANS foi usado (Figura 18B), o aumento da fluorescência foi maior que para o ANS, mas ainda esse aumento é pequeno se comparado com outras proteínas que apresentam sítios de ligação para esses compostos. O sinal de fluorescência do Bis-ANS também saturou em concentrações superiores a 25 μM .

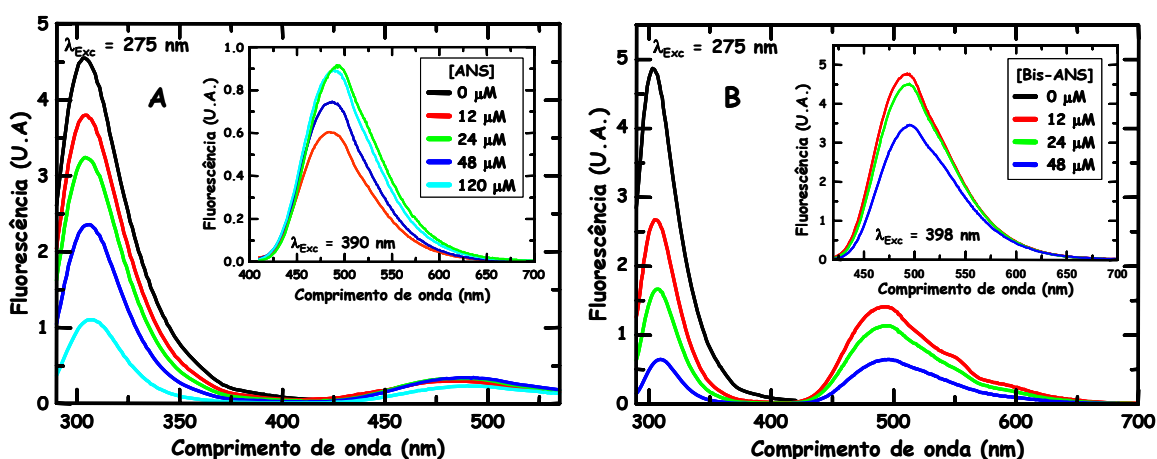


Figura 18 – **Ligação de ANS e Bis-ANS**. Foram adicionados à proteína S64 recombinante ANS (A) e Bis-ANS (B) nas concentrações indicadas. No topo à direita de cada figura é mostrado o espectro de excitação a 390 e 398 nm, respectivamente, e a intensidade de fluorescência foi de aproximadamente 5 (U.A.) para o Bis-ANS, indicando que provavelmente este se ligou um pouco mais à proteína do que o composto ANS, em que a intensidade de fluorescência foi de aproximadamente 1 (U.A.).

3.12. Ligação de sacarose e GTP

3.12.1. Ligação de sacarose medida por fluorescência

A adição de sacarose produz um apagamento da fluorescência intrínseca da proteína S64 recombinante (Figura 19A), que pode ser usado para caracterizar a ligação da sacarose e obter a constante de dissociação. A titulação por sacarose do apagamento de fluorescência da proteína S64 recombinante (Figura 19B) permitiu calcular a constante de dissociação de sacarose, $K_d = 2,79 \pm 0,22$ mM, por meio de uma regressão não-linear dos dados corrigidos e assumindo um único sítio de ligação por monômero.

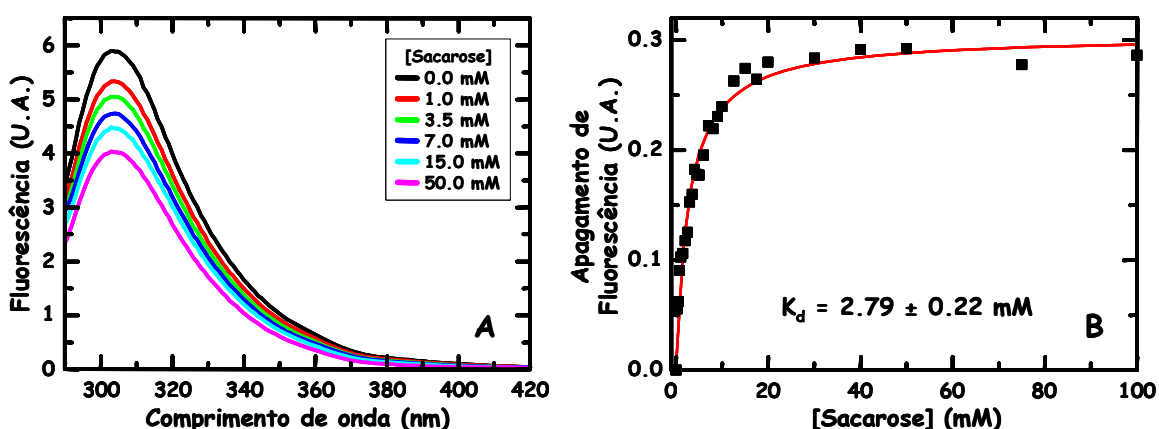


Figura 19 – **Apagamento de fluorescência da proteína S64 recombinante pela adição de sacarose:** A) Espectros de emissão de fluorescência da proteína na ausência e presença de sacarose, cujas concentrações estão indicadas. B) Titulação da proteína S64 recombinante com sacarose. A linha vermelha representa um ajuste não-linear dos dados corrigidos de apagamento de fluorescência.

O comprimento de onda máximo de emissão da proteína não sofreu mudança com a adição de sacarose nas concentrações utilizadas. Isso indica que a proteína não sofreu processos de desnaturação até as concentrações elevadas de ligante utilizadas (100 mM).

3.12.2. Ligação de sacarose medida por dicroísmo circular

O efeito da sacarose sobre o espectro de dicroísmo circular nas regiões do UV-distante (Figura 20A) e UV-próximo (Figura 20B) indica que não foram observadas mudanças significativas na região do UV-distante até uma concentração de 80 mM, em que o espectro a comprimentos de onda menores que 205 nm apresenta elipticidades maiores que o resto dos espectros. Esse efeito foi tratado muito cuidadosamente, porque o espectro da sacarose tem muito mais intensidade que o espectro da proteína, o que pode levar a grandes erros na correção do espectro da proteína na presença de sacarose. Na região do UV-próximo, não foram observadas mudanças significativas em nenhuma concentração de sacarose usada. A falta de efeito nessa região pode indicar que as mudanças observadas na concentração de 80 mM de sacarose na região do UV-distante muito provavelmente são devidas a erros provenientes do grande sinal dicróico da sacarose.

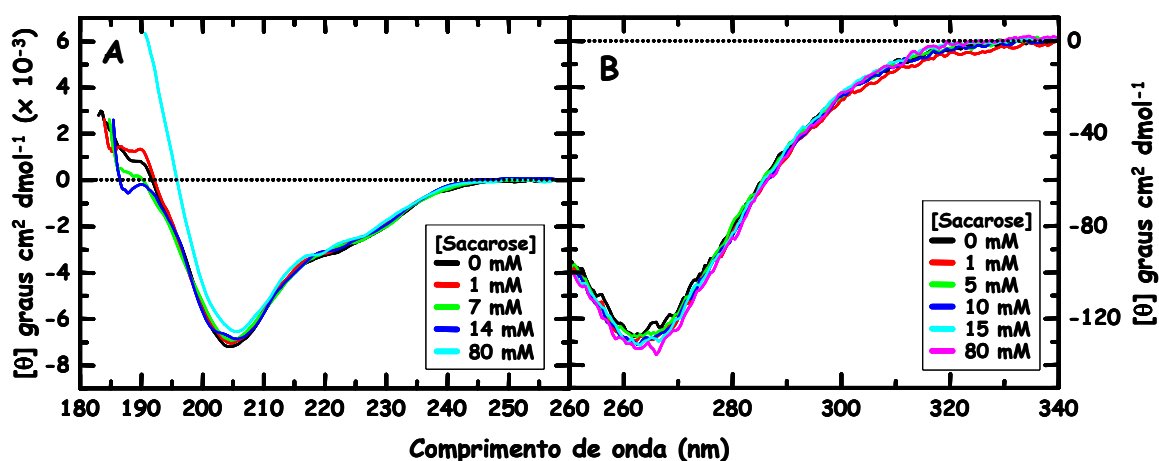


Figura 20 – **Espectros de CD da proteína S64 recombinante em solução na presença e ausência de sacarose:** A) Espectro do UV-distante, observando-se que as intensidades dos picos para cada uma das concentrações usadas permaneceram próximas a 204 nm, com e sem a adição de sacarose, com um ombro em 223 nm, exceto a 80 mM de sacarose. B) Espectro do UV-próximo, sendo verificado um mínimo a 265 nm, sem se notar a presença de nenhum ombro.

3.12.3. Ligação de GTP por ultracentrifugação

A elevada absorção do GTP nas concentrações usadas ($5\ \mu\text{M}$ - $1.000\ \mu\text{M}$) impede o uso de técnicas espectroscópicas como a fluorescência e o dicroísmo circular, que foram usadas no caso da sacarose, para caracterizar a interação dessa molécula com a proteína S64 recombinante.

Para caracterizar a ligação do GTP foi utilizada, assim, uma técnica de centrifugação descrita por Medrano et al. (1991). Na Figura 21 é mostrada a isoterma de ligação do GTP à proteína S64 recombinante. Pode-se observar que a ligação do GTP não saturou nas concentrações usadas nessa titulação. Quanto maior foi a concentração de GTP usada, maior foi o número de sítios de ligação que a proteína apresentou. Esse resultado não é compatível com a presença de um número de sítios de ligação fixo e limitado. A explicação mais simples é a existência de um processo de agregação dependente da concentração do ligante e, ou, da proteína. Um dos problemas da técnica utilizada é que, devido à sedimentação da proteína, a parte inferior do tubo se torna mais concentrada no final do experimento, e muito provavelmente existe um gradiente de concentração ao longo do tubo de centrífuga. Isso torna impossível a medida de processos dependentes da concentração de algum dos componentes.

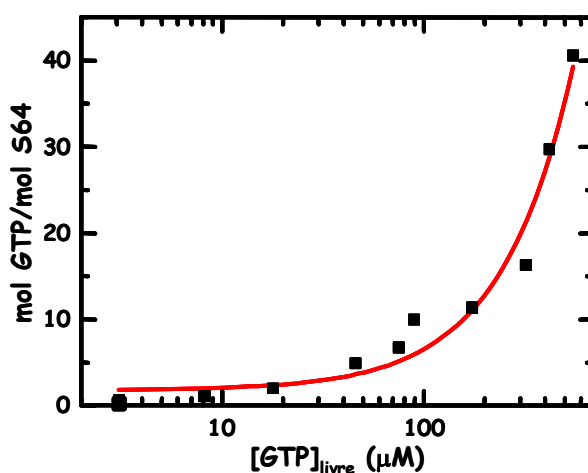


Figura 21 – **Ligação de GTP a S64 recombinante.** Essa ligação é dependente da $[\text{GTP}]$ livre (linha vermelha), não tendo sido observada a saturação dessa interação.

3.12.4. Efeito da sacarose e do GTP sobre o estado de oligomerização

O efeito dos ligantes sacarose e GTP sobre o estado de oligomerização da proteína S64 recombinante foi avaliado por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz. A presença de sacarose, em concentrações saturantes (15 mM), não mudou significativamente o raio de giro da proteína em solução. O raio de giro obtido na presença de sacarose foi de 7,6 nm, correspondente a uma massa molecular de 417 kDa (Figura 22A). Entretanto, a presença de GTP na solução afetou, de forma significativa, o raio de giro da proteína. Concentrações de GTP de 50 μ M (Figura 22B) e 200 μ M (Figura 22C) reduzem o raio de giro para valores de 4,9 e 4,6 nm, respectivamente. Esses valores correspondem a massas moleculares de 141 e 120 kDa. Além da mudança no raio de giro, pode-se observar que, com uma concentração de 50 μ M de GTP, o pico ficou assimétrico, apresentando parte da intensidade com raio de giro maior. Na presença de concentrações maiores de GTP (200 μ M), pode-se observar a presença clara de um segundo pico de menor intensidade com um raio de giro de 16,9 nm (2.515 kDa), que corresponde a um agregado de mais de 45 monômeros.

3.12.5. Efeito da sacarose e do GTP sobre o apagamento de fluorescência

Visando saber se a sacarose e o GTP produzem apagamento da fluorescência intrínseca da proteína e se envolvem mudanças na exposição dos resíduos aromáticos, foram realizados experimentos de apagamento de fluorescência com acrilamida, cloreto de céσιο e iodeto de potássio. Na Figura 23, mostram-se os gráficos de Stern-Volmer para a titulação dos apagadores de fluorescência na ausência e presença de sacarose e GTP. As constantes de Stern-Volmer, K_{SV} , são mostradas na Tabela 2.

A presença dos ligantes na solução não provoca mudanças significativas sobre o apagamento de fluorescência. No caso da acrilamida, parece existir pequeno aumento da acessibilidade dos aminoácidos aromáticos. No iodeto de potássio existe pequena redução da K_{SV} , indicando menor acessibilidade dos resíduos aromáticos. No caso do cloreto de céσιο, nenhuma mudança significativa foi observada.

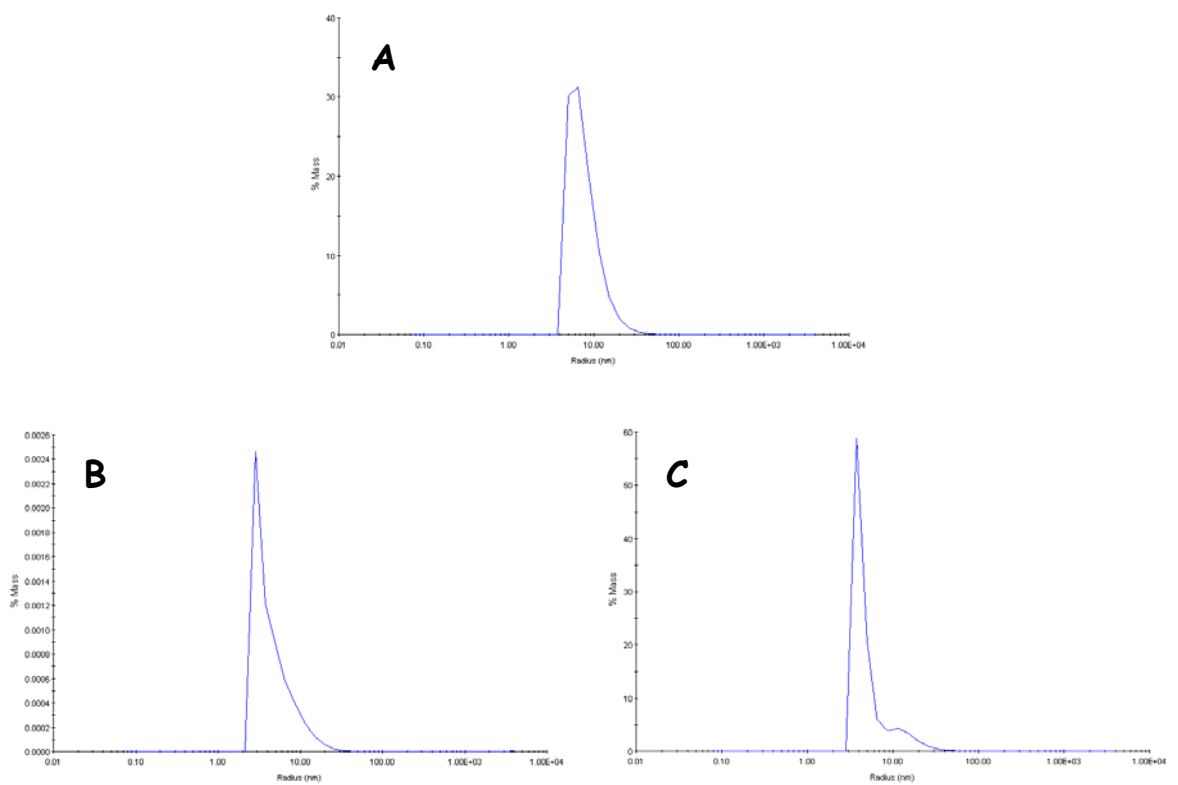


Figura 22 – Gráficos do raio de giro da proteína S64 recombinante na presença de sacarose e GTP: A) 15 mM de sacarose, B) 50 μ M GTP e C) 200 μ M GTP.

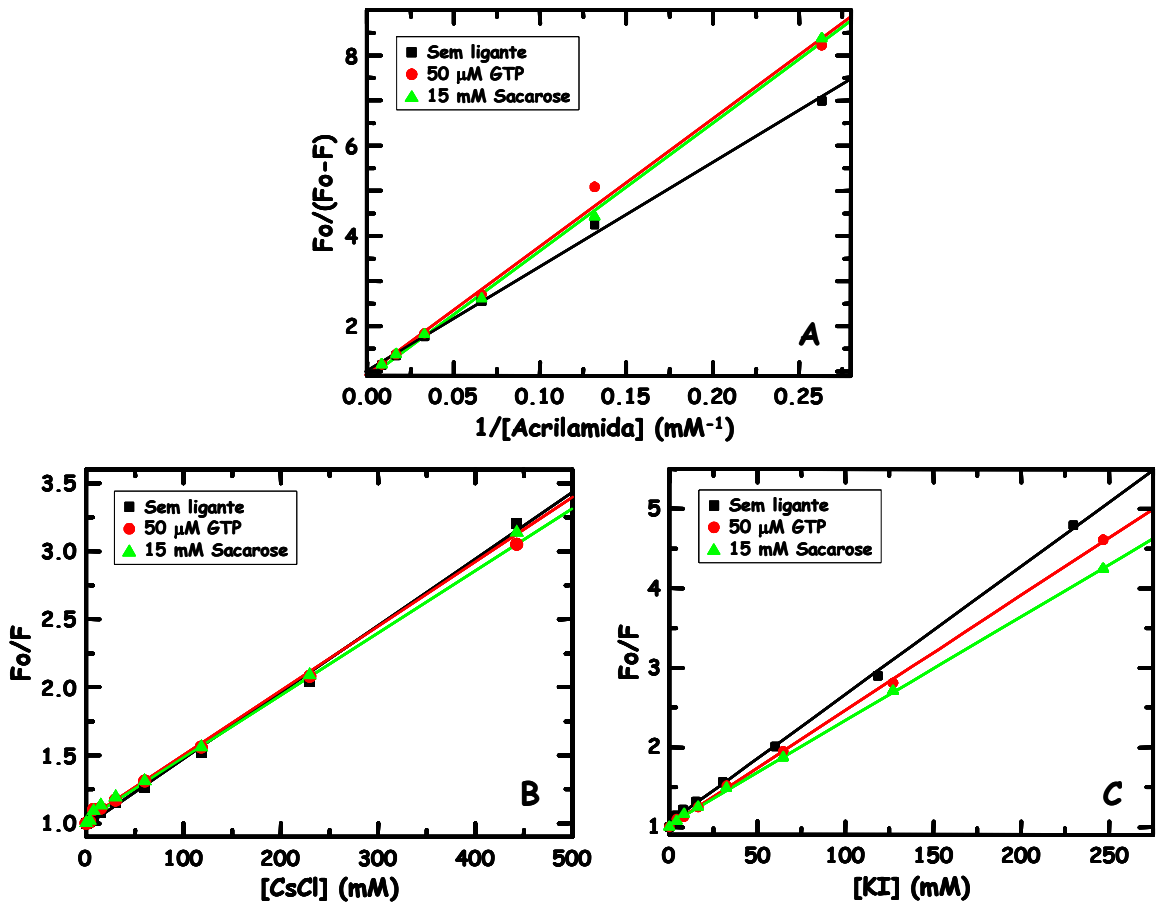


Figura 23 – **Diagramas de Stern-Volmer:** A) A proteína S64 recombinante na presença de acrilamida e com os ligantes GTP e sacarose produziu pequeno apagamento da fluorescência. B) O apagamento de fluorescência da proteína, com cloreto de céσιο na presença ou ausência de ligantes, não se apresentou eficiente. C) A proteína com iodeto de potássio, na presença e ausência dos ligantes GTP e sacarose, sofreu apenas pequeno efeito, visualizado pela diminuição da curva de F_0/F .

Tabela 2 – Constante de Stern-Volmer para a proteína S64 recombinante com a adição de ligantes e apagadores de fluorescência

	Acrilamida	Cloreto de Céσιο	Iodeto de Potássio
Sem ligante	$23,1 \pm 0,5 M^{-1}$	$4,9 \pm 0,1 M^{-1}$	$16,1 \pm 0,2 M^{-1}$
Sacarose (15 mM)	$28,3 \pm 0,5 M^{-1}$	$4,7 \pm 0,1 M^{-1}$	$13,1 \pm 0,1 M^{-1}$
GTP (50 μ M)	$28,3 \pm 1,1 M^{-1}$	$4,6 \pm 0,1 M^{-1}$	$14,4 \pm 0,1 M^{-1}$

3.13. Expressão e purificação da proteína S64 recombinante em grande escala para cristalização

Células de *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pUFV120 (PIROVANI et al., 2002) foram crescidas durante a noite (cerca de 16 horas) na presença de lactose 10 mM como indutor da expressão a 30 °C, como mencionado. A lactose foi incorporada no meio de cultura antes da inoculação com as bactérias. A proteína expressa, tanto com esse método quanto quando induzida com o análogo de lactose, o IPTG fica na fração insolúvel (Figura 24). Mudanças na temperatura de incubação também não levaram a uma expressão da proteína na forma solúvel. Esse fato levou à realização da purificação da proteína insolúvel em condições desnaturantes, na presença de 8 M de uréia.

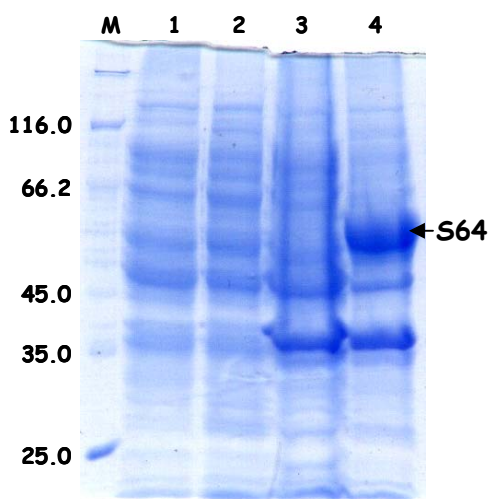


Figura 24 – **Expressão da proteína S64 recombinante.** Análise da expressão da proteína S64 recombinante induzida por lactose, em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. M representa o padrão de massa molecular de ampla faixa, canaleta 1, fração solúvel não-induzida; canaleta 2, fração solúvel induzida; canaleta 3, fração insolúvel não-induzida; e canaleta 4, fração insolúvel induzida.

A proteína foi purificada por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). A proteína S64 recombinante começou a ser eluída da coluna com uma concentração de 150 mM de imidazol, e outra fração da proteína também saiu com uma concentração de 250 mM de imidazol. O perfil da cromatografia é mostrado na Figura 25.

A proteína recombinante renaturada solúvel, sem imidazol e uréia, foi submetida a uma repurificação em condições nativas por IMAC. Nessas condições, ela não se ligou à coluna Hi-TRAP *Chelating* (Amersham Pharmacia Biotech), sendo recuperada somente na fração não ligada (Figura 26). Assim, as frações correspondentes à fração não ligada foram agrupadas e concentradas. O rendimento foi em torno de 15 mg de proteína por litro de cultura.

Como a proteína S64 recombinante, renaturada, e em condições nativas não se ligou na coluna, ela foi submetida a uma repurificação em condições desnaturantes nas mesmas condições anteriores. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas em um gradiente descontínuo de imidazol nas concentrações de 75, 150, 250 e 500 mM (Figura 27). Todas as frações eluídas foram coletadas para análise. A proteína S64 recombinante foi eluída somente na concentração de 75 mM de imidazol. Em seguida, foi concentrada em tubos Amicon® Ultra-15, seguindo-se as recomendações do fabricante, e renaturada através de diálise, como descrito anteriormente.

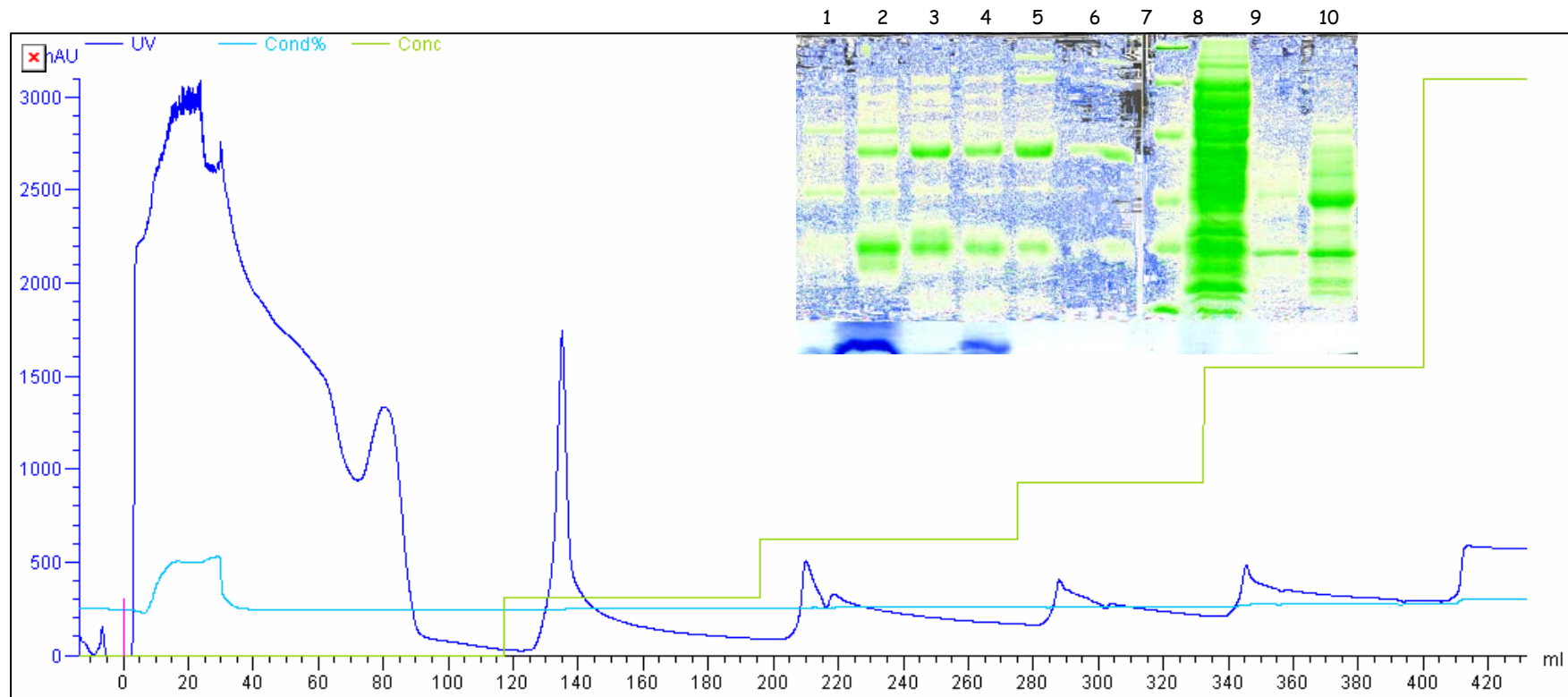


Figura 25 – **Purificação da proteína S64 recombinante.** Esta proteína foi purificada em condições desnaturantes na presença de uréia 8 M em um gradiente descontínuo de imidazol. Cada patamar do perfil cromatográfico representa uma concentração de imidazol, usado para eluir a proteína (0, 50, 100, 150, 250 e 500 mM). A proteína foi recuperada com imidazol nas concentrações de 100, 150 e 250 mM, como pode ser verificado pelos picos apresentados no perfil cromatográfico e pelo gel de poliacrilamida em condições desnaturantes no topo à direita. A primeira canaleta do gel se refere ao padrão de massa molecular em kDa. As canaletas 2 e 3 se referem às frações que não se ligaram à resina, e as outras frações de 4 a 10 se referem à proteína eluída nas concentrações de imidazol de 50, 100, 150 e 250 mM, sendo a canaleta 4 referente ao pico a 50 mM de imidazol; canaletas 5 e 6, amostras do pico a 100 mm de imidazol, início e final do pico; canaletas 7 e 8, amostras do pico a 150 mM de imidazol, início e final do pico; canaletas 9 e 10, amostras do pico a 250 mM de imidazol, início e final do pico.

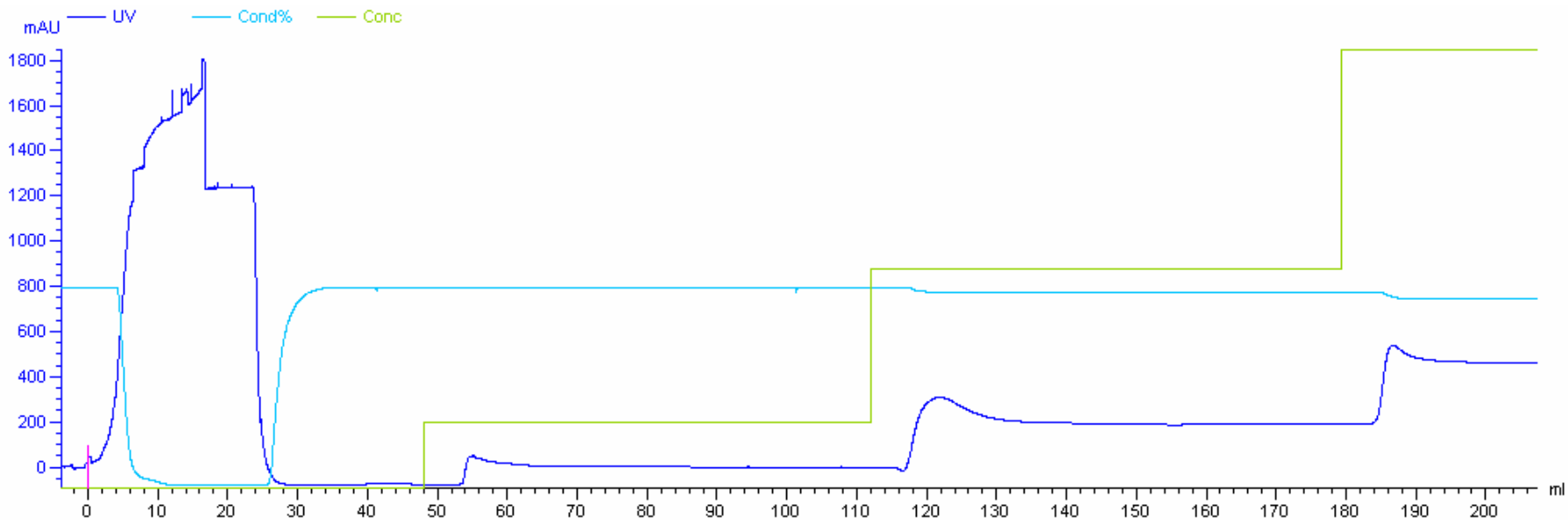


Figura 26 – **Repurificação da proteína S64 recombinante em condições nativas.** A proteína S64 recombinante foi renaturada através de diálise contra o tampão de renaturação, seguida de outra diálise em tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8,0 e foi, então, submetida a uma repurificação em condições nativas. De acordo com o perfil cromatográfico, a proteína S64 recombinante não se ligou à resina, sendo completamente eluída na fração não ligada à resina. Cada patamar representa uma concentração de imidazol (0, 75, 250 e 500 mM) usado para eluir a proteína.

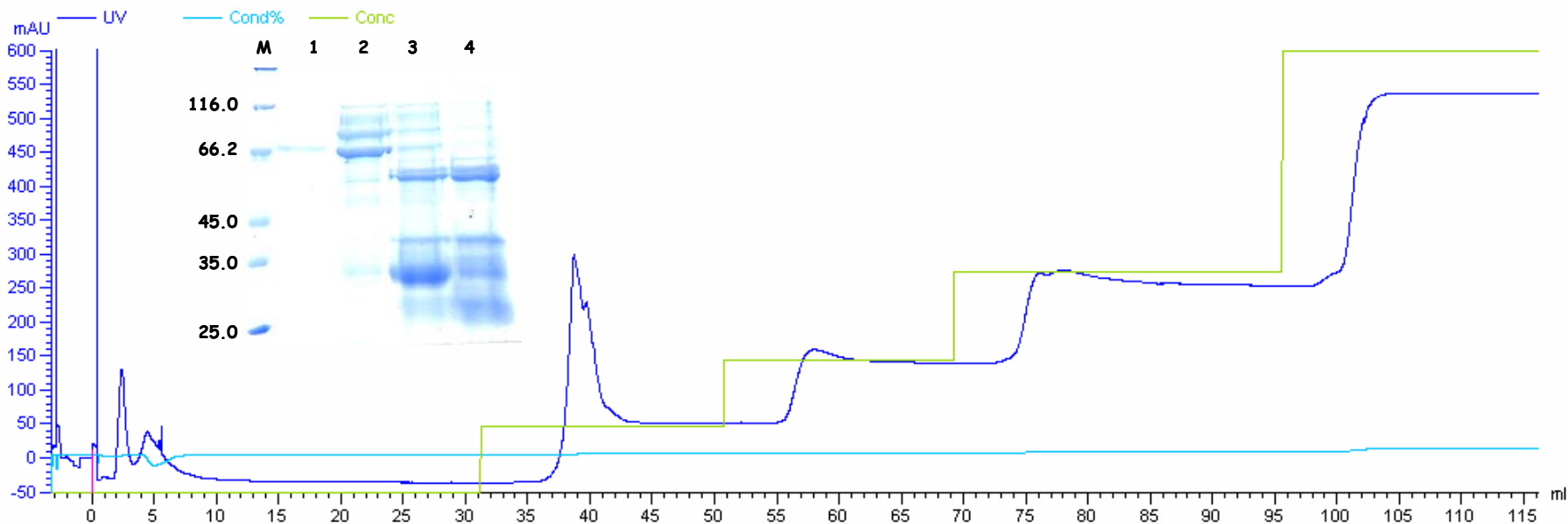


Figura 27 – **Repurificação da proteína S64 recombinante em condições desnaturantes.** A proteína S64 renaturada foi repurificada em condições desnaturantes. No perfil cromatográfico, cada patamar representa uma concentração de imidazol (0, 75, 150, 250 e 500 mM) usado para eluir a proteína. A proteína S64 recombinante foi eluída somente em uma concentração de 75 mM de imidazol (de acordo com o pico mais elevado no perfil cromatográfico). No gel de poliácridamida acima, M indica o padrão de massa molecular de ampla faixa, em kDa, a primeira canaleta representa a fração não ligada e a segunda, terceira e quarta, concentrações de imidazol usado para eluir a proteína (75, 150 e 250 mM, respectivamente).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A análise comparativa deduzida da seqüência da proteína S64 recombinante apontou que ela possui semelhança com as proteínas de armazenamento pertencentes à superfamília cupin, faseolina, canavalina e β -conglucininina (OVERVOORDE et al., 1977; BRAUN et al., 1996). Entretanto, a seqüência da S64 recombinante exibe uma extensão de nucleotídeos no N terminal de aproximadamente 65 resíduos de aminoácidos, correspondentes a três α -hélices, que não está presente nas outras proteínas. Esse motivo estrutural adicional pode favorecer o enovelamento da proteína, de tal maneira que os monômeros se agrupem de modo diferente das outras estruturas já caracterizadas, podendo dificultar o processo de renaturação. A composição de aminoácidos dessa extensão N-terminal é muito curiosa, pois ela possui 15 glutamatos e três aspartatos (28% da cauda), resíduos carregados negativamente e também 10 glutaminas. Essa composição pode evidenciar uma função de localização ou que esses aminoácidos podem ser processados na planta e não existir na forma madura da proteína.

Além disso, a presença da cauda de histidina na proteína recombinante e no amino-terminal pode estar interagindo com esses resíduos e, desse modo, interferindo com o correto enovelamento da proteína. Consistente com essa observação, a proteína recombinante renaturada, induzida com lactose, perdeu a habilidade de se ligar a resinas de Ni^{2+} em condições não-desnaturantes. A cauda de His pode ter favorecido a produção de corpos de inclusão formados

por intermediários de proteínas enoveladas parcialmente, compostas de agregados e polipeptídeos. A renaturação de tais proteínas nas suas formas bioativas é complicada e tediosa, tem recuperação baixa e, portanto, constitui o maior custo para produção de proteínas recombinantes em *E. coli* (SINGH; PANDA, 2005).

Proteínas pertencentes à superfamília cupin estão presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos. A principal característica dos membros dessa família é a presença de uma seqüência com duas regiões conservadas que formam um motivo denominado cupin (DUNWELL; GANE, 1998). O nome cupin, do latim *cupa*, refere-se ao domínio estrutural em forma de barril- β característico das estruturas conhecidas de membros dessa superfamília. S64 recombinante possui dois motivos cupin, o que a situa dentro da superfamília junto com as proteínas bicupin. Dentro do grupo bicupin, a proteína S64 recombinante tem maior semelhança com proteínas de armazenamento de sementes, apresentando alta similaridade de seqüência, incluindo uma seqüência situada entre os dois domínios cupin, com β -conglucina, canavalina e faseolina.

Consistente com sua função como uma proteína de transporte, a caracterização topológica de S64 nas vesículas da membrana plasmática purificada tem demonstrado que uma proporção (25%) de S64 se comporta como uma proteína de membrana do tipo II (OVERVOORDE; GRIMES, 1994). Resíduos conservados que estão envolvidos na estabilização da estrutura tridimensional das proteínas tipo vicilinas são encontrados em posições similares nas proteínas SBP e S64 recombinantes (PIROVANI et al., 2002). Como SBP e S64 recombinantes mostram grande conservação de estrutura primária e motivos terciários idênticos, é muito provável que a proteína SBP/S64 recombinante pode também formar um modelo canônico proposto para a estrutura da família de proteínas tipo vicilinas (PIROVANI et al., 2002). De acordo com a análise da hidrofobicidade da seqüência primária da proteína S64 recombinante, a proteína é predominantemente hidrofílica, embora apresente algumas curtas regiões hidrofóbicas com características de domínio transmembrana (PIROVANI, 1999). Dentre estas, a mais acentuada correspondeu ao terminal amino da proteína, cuja hidrofobicidade é característica de um peptídeo sinal, presente também nas proteínas de reserva

como β -conglucina, faseolina e canavalina, que direciona a síntese da proteína para o lúmen do retículo endoplasmático.

Apesar da forte evidência de que S64 medeia o transporte de sacarose, análises da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos indicam que S64 é distinta de outras proteínas de transporte conhecidas (OVERVOORDE et al., 1997). A funcionalidade da proteína S64 recombinante foi caracterizada quanto à ligação de sacarose que provoca um apagamento de fluorescência dos resíduos aromáticos da proteína. A sacarose mantém contato direto com os aromáticos da proteína ou produz mudança na conformação da proteína, afetando os resíduos de Trp (mudança de ambiente). A afinidade à sacarose pode ser considerada moderada, pois apresentou uma constante de dissociação na ordem de milimolar. Todavia, para proteínas que se ligam à maltose, as constantes de dissociação variam na ordem de micromolar (SZMELCMAN et al., 1976; MILLER et al., 1983; HALL et al., 1997; GUNTAS et al., 2005). Esses dados coincidentemente validam experimentos anteriores da afinidade da SBP/S64 por sacarose (RIPP et al., 1988).

Análises prévias sobre o estado de oligomerização da proteína S64 recombinante, produzida na bactéria *E. coli*, foram conduzidas utilizando-se duas versões da proteína S64 recombinante, uma isenta do peptídeo sinal e uma versão truncada, demonstrando que a proteína, na presença do agente redutor β -mercaptoetanol, comporta-se como monômeros e, na ausência deste agente, como dímeros e trímeros (PIROVANI, 1999). O exame das frações da membrana plasmática sob condições não-redutoras mostrou que S64 existe em complexos multiméricos, podendo representar associações diméricas ou triméricas dos monômeros (OVERVOORDE et al., 1997). Todavia, experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram conduzidos com a proteína S64 recombinante na ausência de ligantes, como também na presença de sacarose ou GTP. A proteína S64 recombinante em solução parece existir na forma de hexâmeros. Assim também, na presença de concentrações elevadas de sacarose, comportou-se semelhantemente. Entretanto, na presença de GTP a proteína S64 recombinante parece existir como trímeros.

Estudos têm demonstrado que a proteína S64 liga-se a GTP através do sítio de ligação a nucleotídeo ALAPTKKS (posições 269-276), que difere da

seqüência consenso (A,G)X(4N)GK(S,T) por apenas dois resíduos (MATRANGOLO, 1998). Essa seqüência encontra-se no mesmo contexto da estrutura secundária do motivo “A” ou “P-loop” (WALKER et al., 1982; SARASTE et al., 1990), formando uma alça flexível entre regiões intramoleculares de α -hélices e folhas- β que, provavelmente, liga-se ao grupamento de fosfatos do nucleotídeo (MATRANGOLO, 1998). Provavelmente essas estruturas não estavam arranjadas estereoquimicamente de forma correta na proteína S64 recombinante e renaturada, favorecendo um processo de agregação da proteína dependente da concentração do ligante e, ou, vice-versa. Portanto, a caracterização da ligação de GTP a S64 recombinante não mostrou nenhum dado coerente devido, provavelmente, à estrutura em que a proteína se encontra. Ensaio complementares deverão ser conduzidos, a fim de elucidar também a possível relação entre a atividade da proteína S64 recombinante, sua ligação a GTP e o seu envolvimento no transporte de sacarose.

Os dados de fluorescência obtidos neste trabalho apontam um espectro com um comprimento de onda máximo de emissão da proteína S64 recombinante a 303 nm. Isso indica que os aminoácidos aromáticos se encontram em um meio extremamente apolar. Esse tipo de emissão foi encontrado somente para a proteína azurina (LADOKHIN, 2000). A azurina é uma pequena proteína globular que se liga a metais e contém um único resíduo de triptofano que exibe um espectro de fluorescência com um comprimento de onda máximo de emissão a aproximadamente 307 nm. O comprimento de onda que a S64 recombinante exibe não é coerente com outras proteínas da mesma família. De fato, a emissão de fluorescência da proteína faseolina (DESHPANDE; DAMODARAN, 1991) apresentou um λ_{\max} de emissão a 329-332 nm, e para a concanavalina o λ_{\max} foi a 332 nm (CHATTERJEE; MANDAL, 2003), indicando que os resíduos aromáticos estão em um meio relativamente hidrofóbico, enterrados no interior dessas proteínas.

As variações de intensidade de fluorescência e o máximo de emissão dos resíduos de Trp em proteínas são atribuídos às diferenças nas formas dos anéis indol excitados do Trp, que interagem com seus microambientes em condições variadas. Essas mudanças no espectro de emissão do Trp também

podem ser em resposta a transições conformacionais da proteína, associação das subunidades, ligação de ligantes ou a própria desnaturação da proteína pelo efeito do pH, temperatura e agentes químicos, todos esses fatores podem afetar o meio ao redor do anel indol.

A estabilidade conformacional de muitas proteínas pode ser determinada através de estudos de desenovelamento, usando-se agentes desnaturantes como cloreto de guanidina e uréia. Esses compostos induzem ao desenovelamento de proteínas oligoméricas, realizando processos multifásicos, com a estabilização de intermediários parcialmente enovelados. De forma semelhante à proteína faseolina, que permaneceu enovelada na presença desses agentes desnaturantes e na temperatura ambiente (DEYER et al., 1992), a proteína S64 renaturada não sofreu desnaturação química, mesmo em concentrações bastante elevadas dos agentes desnaturantes. Em 7,6 M de uréia e 6,7 M de cloreto de guanidina, o espectro de fluorescência da proteína foi caracterizado pelo leve deslocamento do máximo de emissão em comprimentos de onda maiores (+2 nm), indicativo de que um leve processo de desnaturação ocorreu e de que os aromáticos foram capazes de maior liberdade de movimento.

A desnaturação da proteína S64 recombinante também foi monitorada por medidas de fluorescência em função do pH. O efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca pode indicar mudanças conformacionais que acontecem na proteína. No caso da concanavalina A (KHAN et al., 2005), mudanças de pH indicam a maior ou menor exposição dos resíduos de triptofano, devido a mudanças na polaridade do meio e da proteína. Para essa proteína, a valores de pH abaixo de 4 e superiores a 8, a intensidade de fluorescência foi diminuída, podendo indicar uma exposição dos grupos aromáticos a um ambiente mais polar. A valores de pH inferiores a 4, os resíduos tendem à protonação de aminoácidos ácidos, como aspartato e glutamato, podendo resultar em mudanças nas propriedades de solvatação da proteína, como também na perda de interações eletrostáticas, como as pontes salinas que auxiliam a estabilização das estruturas secundárias/terciárias (SHOEMAKER et al., 1985; MARGUSEE; BALDWIN, 1987). Essas mudanças podem efetivamente desestabilizar a estrutura da proteína (FAIRMAN et al., 1989). Elevando-se o pH da solução, para a proteína faseolina por exemplo

(DYER et al., 1992) foi verificado um efeito muito mais dramático na sua estabilidade do que para a S64 renaturada, em que a intensidade de fluorescência foi diminuída gradativamente. Com o aumento do pH a 7,5, o espectro da faseolina atingiu um padrão de desnaturação alterado. Após a desnaturação inicial, o espectro de fluorescência diminuiu linearmente até pH 8,5 e, acima deste, resultou em um espectro linear indicativo de proteínas desnaturadas (desprotonação dos aminoácidos), na temperatura ambiente (DYER et al., 1992). A S64 renaturada, por sua vez, apresentou efeito limitado quando comparado com o da faseolina a valores de pH extremos, como dito anteriormente, pois a intensidade de fluorescência diminuiu gradativamente, sem nenhum efeito indicativo de proteína desnaturada.

O comportamento da proteína S64 renaturada em solução também foi avaliado pelo uso de sondas fluorescentes sensíveis à polaridade externa, ANS e Bis-ANS. Esses compostos se ligam não especificamente a superfícies hidrofóbicas em muitas proteínas, com aumento na intensidade de fluorescência, juntamente com mudança no comprimento de onda de emissão máxima (SLAVIK, 1982). Para a proteína S64 recombinante, o Bis-ANS ligou-se um pouco mais à proteína do que o ANS, verificado pelo aumento na intensidade de fluorescência emitida. Como esses compostos se ligam a bolsões hidrofóbicos nas proteínas, pode-se concluir que o Bis-ANS teve maior poder de penetração nessas regiões.

Uma vez que muitas proteínas, como a S64 recombinante, contêm um número relativamente pequeno de resíduos aromáticos, tais aminoácidos recebem considerável atenção em estudos topográficos. Para visualizar a exposição dos anéis indol à perturbação do solvente (HERSKOVITS, 1967; WILLIAMS et al., 1965), técnicas de modificações químicas (HACHIMORI et al., 1964; FRAZIER et al., 1973) são freqüentemente exploradas. Entretanto, há muitas limitações e dificuldades experimentais com o uso desses métodos. Uma técnica espectroscópica promissora envolve o apagamento de fluorescência dos resíduos aromáticos por adição de vários agentes de baixo peso molecular (LEHRER, 1975). Esses agentes, conhecidos como *quenchers* ou apagadores de fluorescência, diminuem a intensidade de fluorescência dos resíduos de Trp via contatos físicos com os aromáticos excitados. Entretanto, a

facilidade na qual um fluoróforo é apagado depende da sua exposição aos apagadores.

Acrilamida é um composto polar, não-iônico, que apaga a fluorescência de aminoácidos aromáticos pelo processo de colisão (EFTINK; GIRON, 1976). A acrilamida tem a capacidade de apagar qualquer resíduo de aminoácido aromático excitado com o qual colida independentemente se o resíduo está localizado na superfície ou no interior apolar da proteína, gerando informações locais ou de flutuações conformacionais em larga escala da proteína (EFTINK; GHIRON, 1976; DESHPANDE; DAMODARAN, 1991).

Sondas carregadas como iodeto de potássio ou cloreto de céσιο também são capazes de produzir o apagamento de fluorescência por colidirem com grupos ionizáveis ao redor dos resíduos aromáticos, modificando o espectro de emissão de fluorescência.

Nos experimentos de apagamento de fluorescência, CsCl, KI e acrilamida, apagadores ou *quenchers* externos adicionados, reduziram a intensidade de fluorescência dos aminoácidos aromáticos de maneira proporcional à concentração desses compostos. Dada a diferença de tamanho e carga dessas moléculas, o apagamento da fluorescência intrínseca da proteína S64 renaturada forneceu informação sobre a localização dos resíduos aromáticos. Com a acrilamida, o apagamento foi mais efetivo devido à maior penetração dessa molécula na matriz protéica, usando-se menores concentrações dessa molécula do que para o apagamento com KI ou CsCl. Provavelmente, ao redor dos aminoácidos aromáticos da S64 recombinante se encontram, em maior proporção, resíduos carregados positivamente do que negativamente, favorecendo o efeito do KI, como verificado pelo apagamento promovido, em vez de CsCl. Com a adição dos ligantes sacarose e GTP, não houve mudanças significativas sobre o apagamento de fluorescência. De acordo com as constantes de Stern-Volmer obtidas, a proteína S64 recombinante apresentou os aminoácidos aromáticos bastante expostos com e sem ligantes, quando comparado com a K_{sv} encontrada em moléculas com todos os resíduos de triptofano livres ($K_{sv} = 18,0$) (BUSHUEVA et al., 1980). A sacarose é um açúcar, portanto está rodeada por grupos -OH que se ligam a regiões com cargas positivas, desfavorecendo os contatos da molécula KI. Isso pode ser verificado pela diminuição significativa do valor da constante de Stern-

Volmer para essa molécula, com a adição de sacarose quando comparada com os valores dessa constante, que permaneceram sem alteração significativa, para acrilamida e CsCl com a adição desse açúcar. Os dados de fluorescência indicam que os resíduos dos aminoácidos aromáticos se encontram bastante “enterrados” na proteína S64 recombinante. Já os dados de apagamento de fluorescência indicam que a proteína S64 recombinante possui os resíduos de aminoácidos aromáticos bastante expostos, dificultando a interpretação exata desses dados.

Valores baixos da constante de Stern-Volmer (K_{sv}), encontrados nas proteínas como β -tripsina ($2,4 \text{ M}^{-1}$), RNase T ($1,0 \text{ M}^{-1}$) e aldolase ($0,2 \text{ M}^{-1}$), indicam que todos os resíduos de Trp dessas proteínas podem estar “enterrados”, semelhantemente à azurina (EFTINK; GHIRON, 1977). Ao contrário, pode ser considerado que a proteína S64 recombinante possui todos os aminoácidos aromáticos bastante expostos, uma vez que os valores da K_{sv} foram elevados e os gráficos de Stern-Volmer mostraram-se lineares, especificamente para a proteína na presença de KI e CsCl, podendo sumarizar que há uma população de fluoróforos com graus similares de exposição a esses dois agentes apagadores. Para a acrilamida, devido ao seu maior poder de penetração, podem-se visualizar duas populações de fluoróforos com graus de exposição diferentes a esse composto, pois os gráficos não foram lineares, apresentando uma população de moléculas muito exposta e outra que somente a acrilamida consegue acessar.

Em resumo, em solução as moléculas protéicas poderão estar sujeitas a uma ampla variedade de flutuações conformacionais (LINDERSTROM-LANG; SCHELLMAN, 1959; WEBER, 1975), efeito que pode estar ocorrendo para a S64 renaturada também. A frequência dessas flutuações pode ser regulada por interações intramoleculares que estabilizam a estrutura das proteínas. Como resultado da sua mobilidade, um resíduo que parece “enterrado” na sua estrutura pode tornar-se periodicamente exposto em solução, provavelmente devido à quebra das pontes de hidrogênio (EFTINK; GHIRON, 1977). O processo de renaturação pode gerar formas estruturais protéicas diferentes.

Informações estruturais relevantes sobre a proteína S64 renaturada também foram obtidas pela técnica de dicroísmo circular. O dicroísmo circular refere-se à absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à

direita, após a luz passar pela amostra (KELLY; PRICE, 1997). Essa técnica espectroscópica é útil para detectar dados da estrutura secundária da proteína, dentre outras características: mudanças conformacionais de macromoléculas, composição de misturas quirais, interação de macromoléculas com outras moléculas menores, especialmente aquirais etc.

Para a proteína S64 renaturada, de acordo com os dados de CD, no UV-distante, observa-se a ausência de padrões característicos de estrutura secundária da proteína quando em ambiente aquoso. A proteína apresenta um sinal no UV-próximo que indica que ela está enovelada. Entretanto, esses sinais não informam sobre o correto enovelamento da proteína, uma vez que não se dispõe da S64 recombinante nativa, enovelada corretamente, para dados comparativos.

Na presença de sacarose, não foram observadas mudanças significativas, e a proteína permaneceu enovelada e sem um perfil característico de estrutura secundária, como também no ambiente dos aromáticos. A adição de sacarose não produz nenhuma mudança conformacional, como pôde ser verificado pela ausência de efeitos significativos sobre os espectros de CD no UV-próximo e distante.

Aparentemente, com base nos espectros de desnaturação térmica é possível dizer que a proteína S64 recombinante é estável termicamente. Os espectros começaram a perder intensidade com o aumento da temperatura, e somente em temperaturas muito elevadas, a 95 °C, foi observada uma pequena diferença na forma desses espectros, e o sinal se deslocou, próximo a 202 nm, indicando uma leve desnaturação. Esse efeito assemelha-se ao ocorrido com a proteína faseolina, que não se desnaturou nessas condições (DEYER et al., 1992). A desnaturação térmica da faseolina requer mais de um agente desnaturante simultaneamente, como a presença de (GdnHCl) e variações de pH.

A alta estabilidade da proteína S64 recombinante, como também das outras proteínas de armazenamento, pode ser relatada pelo fato de que, na natureza, a integridade estrutural dessas proteínas pode ser mantida na dessecação, durante a maturação das sementes e a subsequente dormência.

Uma vez que a proteína recombinante purificada para fins cristalográficos foi encontrada na fração insolúvel do extrato e que ela, em

condições nativas, não se ligou à resina de níquel, questiona-se o fato de a referida proteína se encontrar na sua forma nativa e, conseqüentemente, em condições ideais para cristalografia, já que até o presente momento não foi verificada a formação de cristais.

Dessa forma, a proteína S64 recombinante deverá ser novamente obtida nas condições utilizadas para a caracterização bioquímica ou ser clonada com mudanças na posição da cauda de histidina do N para o C-terminal ou até mesmo se fazer a retirada dos nucleotídeos extras presentes no N-terminal da S64 recombinante, que não estão presentes nas outras proteínas de armazenamento. Assim, a proteína S64 recombinante deverá ser outra vez submetida a novos ensaios cristalográficos.

5. REFERÊNCIAS

ADLER, A.J.; GREENFIELD, N.J.; FASMAN, G.D. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. **Methods Enzymol**, v. 27, p. 675-735, 1973.

ALDAPE, M.J.; ELMER, A.M.; CHAO, W.S.; GRIMES, H.D. Identification and characterization of a sucrose transporter isolated from the developing cotyledons of soybean Mike. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 409, p. 243-250, 2003.

ALLEN, R.G.; NEWTON, R. K.; FARMER, K.J.; NATIONS, C. Effects of the free radical generator paraquat on differentiation, superoxide dismutase, glutathione and inorganic peroxides in microplasmodia of *Physarum polycephalum*. **Cell Tissue Kinet**, v. 1, n. 8, p. 623-630, 1985.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARGOS, P.; NARAYANA, S.V.L.; NIELSEN, N.C. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. **Journal EMBO**, v. 2, p. 1111-1117, 1985.

BARKER, L.; KÜHN, C.; WEISE, A.; SCHULZ, A.; GEBHARDT, C.; HIRNER, B.; HELLMAN, H.; SCHULZE, W.; WARD, J.M.; FROMMER, W.B. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1153-1164, 2000.

BÄUMLEIN, H.; BRAUN, H.; KAKHOVSKAYA, I.A.; SHUTOV, A.D. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. **Journal Molecular Evolution**, v. 41, p. 1070-1075, 1995.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **The physiology and biochemistry of seeds.** Berlin: Springer-Verlag, 1978. v. 1, 306 p.

BIRKS, J.B. Photophysics of aromatic molecules. **Wiley-Interscience**, New York, v. 10, p. 433-447, 1970.

BITTIGER, H.; SCHNEBLI, H.P. **Concanavalin A as a tool.** New York: John Wiley & Sons, Ltda.; London, 1976. 639 p.

BLAGROVE, R.J.; LILLEY, G.G.; Van DONKELAAR, A.; SUN, S.M.; HALL, T.C. Structural studies of a french bean storage protein: phaseolin. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 6, p. 137-141, 1984.

BOHM, G.; MURH, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering**, v. 5, p. 191-195, 1992.

BRAUN, H.; CZIHAL, A.; SHUTOV, A.D.; BÄUMLEIN, H. A vicilin-like seed protein of cycads: Similarity to sucrose binding proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 35-44, 1996.

BROWN, J.W.S.; BLISS, F.A.; HALL, T.C. Linkage relationships between genes controlling seed proteins in french bean. **Genetic Engineering Applications to Agriculture**, v. 60, p. 251-259, 1981.

BÜRKLE, L.; HIBBERD, J.M.; QUICK, W.P.; KÜHN, C.; HIRNER, B.; FROMMER, W.B. The Hmais-sucros cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 118, p. 59-68, 1998.

BUSHUEVA, T.L.; BUSEL, E.P.; BURSTEIN, F.A. Some regularities of dynamic accessibility of buried fluorescent residues to external quenchers in proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 204, n. 1, p. 161-166, 1980.

CARD, P.J.; HITZ, W.D. Synthesis of 1'-deoxy-1'-fluorosucrose via sucrose synthetase mediated coupling of 1-deoxy-1-fluorofructose with uridine diphosphate glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 106, p. 5348-5350, 1984.

CARD, P.J.; HITZ, W.D.; RIPP, K.G. Chemoenzymic syntheses of fructose-modified sucroses via multienzyme systems. Some topographical aspects of the binding of sucrose to a sucrose carrier protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 108, p. 158-161, 1986.

CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.L. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **The Journal of Nutrition.**, v. 125, p. 594S-597S, 1995.

CARTER, C.; GRAHAM, R.A.; THORNBURG, R.W. Nectarin I is a novel, soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana* sp. **Plant Molecular Biol.**, v. 41, p. 207-216, 1999.

CASEY, R.; DOMONEY, C.; STANLEY, J. Convicilin mRNA from pea (*Pisum sativum* L.) has sequence homology with other legume 7S storage protein mRNA species. **Biochemistry Journal**, v. 224, n. 2, p. 661-666, 1984.

CHATTERJEE, A.; MANDAL D.K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1648, p. 174-183, 2003.

CONTIM, L.A.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; DEL'U-FILHO, N.; PIROVANI, C.P.; CLARINDO, W.R.; LOUREIRO, M.E.; FONTES, E.P.B. The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression of the S642 promoter. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 393, p. 2643-2653, 2003.

CREAMER, L.K.; JIMENEZ-FLORES, R.; RICHARDSON, T. Genetic modification of food proteins. **Trends Biotechnology**, v. 6, p. 163-169, 1988.

CSERZO, M.; WALLIN, E.; SIMON, I.; Von HEIJNE, G.; ELOFSSON, A. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. **Protein Engineering**, v. 10, p. 673-676, 1997.

DELÚ-FILHO, N.; PIROVANI, C.P.; PEDRA, J.H.F.; MATRANGOLO, F.S.V.; MACÊDO, J.N.A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in transgenic tobacco suspension-cultured cells. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 353-361, 2000.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p. 3-24, 1976.

DESHPANDE, S.S.; DAMODARAN, S. Denaturation behavior of phaseolin in urea, guanidine hydrochloride, and sodium dodecyl sulfate solutions. **Journal of Protein Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 103-115, 1991.

DEYER, J.M.; NELSON, J.W.; MURAI, N. Biophysical analysis of phaseolin denaturation induced by urea, guanidinium chloride, pH, and temperature. **Journal of Protein Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 281-288, 1992.

DICKINSON, C.D.; HUSSEIN, E.H.A.; NIELSEN, N.C. Role of posttranslational cleavage in glycinin assembly. **Plant Cell**, v. 1, p. 459-469, 1989.

DOYLE, J.J.; LADIN, B.F.; BEACHY, R.N. Antigenic relationship of legume seed proteins to the 7S seed storage protein of soybean. **Biochemistry Syst. Ecol.**, v. 13, p. 123-132, 1985.

DOYLE, J.J.; SCHULER, M.A.; GODETTE, W.D.; ZENGER, V.; BEACHY, R.N.; SLIGHTOM, J.L. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. **Journal Biological Chemistry**, v. 261, p. 9228-9238, 1986.

DUNWELL, J.M. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 1-32, 1998.

DUNWELL, J.M.; GANE, J. Microbial relatives of seeds storage proteins: conservation of motifs in a functionally diverse superfamily of enzymes. **Journal Molecular Evolution**, v. 46, p. 147-154, 1998.

DUNWELL, J.M.; KHURI, S.; GANE, P.J. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 153-179, 2000.

EFTINK, M.R.; GHIRON, C.A. Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics. **Biochemistry**, v. 16, n. 25, p. 5546-5551, 1977.

EFTINK, M.R.; GHIRON, C.A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 672-680, 1976.

ELMER, A.; SHAO, W.; GRIMES, H. Protein sorting and expression of a unique soybean cotyledon protein, GmS64, destined for the protein storage vacuole. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 3, p. 1089-1106, 2003.

FAIRBANKS, G.; STECK, T.L.; WALLACH, D.F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry**, v. 10, p. 2606-2617, 1971.

FAIRMAN, R.; SHOEMAKER, K.R.; YORK, E.J.; STEWART, J.M.; BALDWIN, R.L. Further studies of the helix dipole model: effects of a free alpha-NH₃⁺ or alpha-COO⁻ group on helix stability. **Proteins: Struct. Funct. Gen.**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 1989.

FORESTI, O.; FRIGERIO, L.; HOLKERI, H.; VIRGILIO, M.; VAVASSORI, S.; VITALE, A. A phaseolin domain involved directly in trimer assembly is a determinant for binding by the chaperone BiP. **The Plant Cell**, v. 15, p. 2462-2475, 2003.

FRAZIER, W.A.; HOGUE-ANGELETTI, R.A.; SHERMAN, R.; BRADSHAW, R.A. Topography of mouse 2.5S nerve growth factor. Reactivity of tyrosine and tryptophan. **Biochemistry**, v. 12, n. 17, p. 3281-3293, 1973.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D.L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

FRIGERIO, L.; VIRGILIO, M.; PRADA, A.; FAORO, F.; VITALE, A. Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. **Plant Cell**, v. 10, p. 1031-1042, 1998.

FRÖMMER, W.B.; SONNEWALD, U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 587-607, 1995.

GANE, P.J.; DUNWELL, J.M.; WARWICKER, J. Modelling based on the structure of vicilins predicts a histidine cluster in the active site of oxalate oxidase. **Journal Molecular Evolution**., v. 46, p. 488-493, 1998.

GATEHOUSE, J.A.; CROY, R.R.D.; MORTON, H.; TYLER, M.; BOULTER, D. Characterisation and subunit structures of the vicilin storage proteins of pea (*Pisum sativum* L.). **European Journal of Biochemmistry**, Tokyo, v. 118, n. 3, p. 627-633, 1981.

GIBBS, P.E.M.; STRONGIN, K.B.; McPHERSON, A. Evolution of legume seed storage proteins-a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. **Molecular Biological and Evolution**., v. 6, p. 614-623, 1989.

GILL, S.C.; Von HIPPEL, P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analitical Biochemistry**, v. 182, p. 319-326, 1989.

GRIMES, H.D.; OVERVOORDE, P.J.; RIPP, K.; FRANCESCHI, V.R.; HITZ, W.D. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **Plant Cell**., v. 4, p. 1561-1574, 1992.

GUNTAS, G.; MANSELL, T.J.; KIM, J.R.; OSTERMEIER, M. Directed evolution of protein switches and their application to the creation of ligand-binding proteins. **PNAS**, v. 102, n. 32, p. 11224-11229, 2005.

HACHIMORI, Y.; HORINISHI, H.; KURIHARA, K.; SHIBATA, K. States of amino acid residues in proteins. V. Different reactivittes with H₂O₂ of tryptophan residues in lysozyme, proteinases and zymogens. **Biochimica et Biophysica Acta**., v. 93, p. 346, 1964.

HALL, J.A.; GANESAN, A.K.; CHEN, J.; NIKAIDO, H. Two modes of ligand binding in maltose-binding protein of Escherichia coli. Functional significance in active transport. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17615-17622, 1997.

HERSKOVITS, T.T. Difference spectroscopy. **Methods Enzymol.**, v. 11, p. 748-775, 1967.

HITZ, W.D.; CARD, P.J.; RIPP, K.G. Substrate recognition by a sucrose transporting protein. **Journal Biological Chemistry**, v. 261, p. 11986-11991, 1986.

HOWLETT, G.J.; YEH, E.; SCHACHMAN, H.K. Protein-ligand binding studies with a table-top, air-driven high-speed centrifuge. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 190, n. 2, p. 809-819, 1978.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal Molecular Biology**, v. 292, p. 195-202, 1999.

KAMATA, Y.; OTSUKA, S.; SATO, M.; SHIBASAKI, K. Limited proteolysis of soybean beta-conglycinin. **Journal of Agricultural Biology Chemistry**, v. 46, p. 2829-2834, 1982.

KELLY, S.M.; PRICE, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1138, p. 161-185, 1997.

KHAN, R.H.; NAEEM, A.; BAIG, M.A. Spectroscopic studies on the protective effect of a specific sugar on concanavalin a at acidic, neutral and alkaline pH. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 61-72, 2005.

KLOZ, J.; KLOZOVA, E. The protein euphaseolin in Phaseolinae, a chemotaxonomical study. **Biology Plant**, v. 16, p. 290-300, 1974.

KO, T.P.; NG, J.D.; McPHERSON, A. The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Plant Physiology**, v. 101, p. 729-744, 1993.

KÜHN, C.; QUICK, W.P.; SCHULZ, A.; SONNEWALD, U.; FROMMER, W.B. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. **Plant Cell Environ.**, v. 19, p. 1115-1123, 1996.

LADOKHIN, A.S. **Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis in encyclopedia of analytical chemistry**. MEYERS, R.A. (Ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000. 5779 p.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALONDE, S.L.; BOLES, E.; HELLMANN, H.; BARKER, L.; PATRICK, J.W.; FROMMER, W.B.; WARD, J.M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. **The Plant Cell**, v. 11, p. 707-726, 1999.

LANE, B.G.; DUNWELL, J.M.; RAY, J.; SCHMITT, M.R.; CUMING, A.C. Germin, a marker of early plant development, is an oxalate oxidase. **Journal Biological Chemistry**, v. 268, p. 12239-12242, 1993.

LAWRENCE, M.C.; IZARD, T.; BEUCHAT, M.; BLAGROVE, R.J.; COLMAN, P.M. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. **Journal Molecular Biology**, v. 238, p. 748-776, 1994.

LAWRENCE, M.C.; SUZUKI, E.; VARGHESE, J.N.; DAVIS, P.C.; DONKELAAR, A.V.; TULLOCH, P.A.; COLMAN, P.M. The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Å resolution. **EMBO Journal**, v. 9, p. 9-15, 1990.

LEHRER, S.S. Intramolecular crosslinking of tropomyosin via disulfide bond formation: evidence for chain register. **Biochemistry**, v. 72, n. 9, p. 3377-3381, 1975.

LEHRER, S.S. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. **Biochemistry**, v. 10, n. 17, p. 3254-3263, 1971.

LEMOINE, R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1, p. 246-262, 2000.

LEMOINE, R.; BURKLE, L.; BARKER, L.; SAKR, S.; KUHN, C.; REGNACQ, M.; GAILLARD, C.; DELROT, S.; FROMER, W.B. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. **FEBS Lett.**, v. 454, n. 3, p. 325-330, 1999.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. **The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine.** New York, USA: Academic Press, 1986.

LINDERSTROM-LANG, K.U.; SCHELLMAN, J.A. Protein structure and enzyme activity. In: BOYER, P.D. (Ed.). **The enzymes.** 2nd. ed. New York, USA: Academic Press, 1959. p. 443-510.

LORIS, R.; HAMELRYCK, J.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

LOVATI, M.R.; MANZONI, C.; GIANAZZA, E.; SIRTORI, C.R. Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active β -conglycinin subunits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2474-2480, 1998.

LYCETT, G.W.; DELAUNEY, A.J.; GATEHOUSE, J.A.; GILROY, J.; CROY, R.R.D.; BOULTER, D. The vicilin gene family of pea (*Pisum sativum* L.): a complete cDNA coding sequence for preprovicilin. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, n. 8, p. 2367-2380, 1983.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; CHERUKURI, P.F.; DEWEESE-SCOTT, C.; GEER, L.Y.; GWADZ, M.; HE, S.; HURWITZ, D.I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C.J.; LIEBERT, C.A.; LIU, C.; LU, F.; MARCHLER, G.H.; MULLOKANDOV, M.; SHOEMAKER, B.A.; SIMONYAN, V.; SONG, J.S.; THIESSEN, P.A.; YAMASHITA, R.A.; YIN, J.J.; ZHANG, D.; BRYANT, S.H. "CDD: a conserved domain database for protein classification". **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. 192-196, 2005.

MARGER, M.D.; SAIER, M.H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends Biochemistry Science**, v. 18, n. 1, p. 13-20, 1993.

MARGUSEE, S.; BALDWIN, R.L. Helix stabilization by Glu-...Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design. **Biochemistry**, v. 84, n. 24, p. 8898-8902, 1987.

MARUYAMA, N.; ADACHI, M.; TAKAHASHI, K.; YAGASAKI, K.; KOHNO, M.; TAKENAKA, Y.; OKUDA, E.; NAKAGAWA, S.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin homotrimers, **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 3595-3604, 2001.

MARUYAMA, N.; KATSUBE, T.; WADA, Y.; OH, M.H.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; OKUDA, E.; NAKAGAWA, S.; UTSUMI, S. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features. **European Journal of Biochemistry**, v. 258, p. 854-862, 1998.

MARUYAMA, N.; RAMLAN, M.S.; TAKAHASHI, K.; YAGASAKI, K.; GOTO, H.; HONTANI, N.; NAKAGAWA, S.; UTSUMI, S. The effect of the N-linked glycans on structural features and physicochemical functions of soybean β -conglycinin homotrimers. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 79, p. 139-144, 2002.

MARUYAMA, N.; MARUYAMA, Y.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. Structure of the core region of the soybean β -conglycinin α ' subunit. **Biological crystallography**, v. 60, p. 289-297, 2004.

MATRANGOLO, F.S. **Caracterização de uma proteína secretória de soja e de sua interação com BiP**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

McGUFFIN, L.L.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, p. 404-405, 2000.

MEDRANO, F.J.; ANDREU, J.M.; GORBUNOFF, M.J.; TIMASHEFF, S.N. Roles of ring C oxygens in the binding of colchicine to tubulin. **Biochemistry**, v. 30, p. 3770-3777, 1991.

MEMBRÉ, N.; BERNA, A.; NEUTELINGS, G.; DAVID, A.; DAVID, H.; STAIGER, D.; VASQUÉZ, J.S.; RAYNAL, M.; DELSENY, M.; BERNIER, F. cDNA sequence, genome organization and differential expression of three Arabidopsis genes for germin/oxalate oxidase-like proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 459-469, 1997.

MERTENS, M.L.; KÄGI, J.H.R. A graphical correction procedure for inner filter effect in fluorescence quenching titrations. **Analytical Biochemistry**, v. 96, p. 448-455, 1979.

MILLER, D.M.; OLSON, J.S.; PFLUGRATH, J.W.; QUIOCHO, F.A. Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. **Journal Biological Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13665-13672, 1983.

MILLERD, A. Biochemistry of legume seed proteins. **Annual Review Plant Physiology**, v. 26, p. 53-72, 1975.

MÜNTZ, K.; JUNG, R.; SAALBACH, C. Synthesis, processing, and targeting of legume seed proteins. **Proc. Phytocenz. Soc. Eur.**, v. 35, p. 128-146, 1993.

NAKAGAWA, Y.; ASAI, H.; MIURA, T.; KITOH, J.; MORI, H.; NAKANO, K. Increased expression of 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase gene in brain of epilepsy-prone E1 mice. **Brain Research. Molecular Brain Research.**, v. 58, n. 211, p. 132-137, 1998.

NIELSEN, N.C.; NANI, Y.W.; BEAMAN, T.; OLIVIERA, L.O.; BASSUNER, R. Synthesis and assembly of 11s globulins. **Journal Plant Physiology**, v. 145, p. 641-647, 1995.

NUTTALL, J.; VITALE, A.; FRIGERIO, L. C-terminal extension of phaseolin with a short methionine-rich sequence can inhibit trimerisation and result in high instability. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 885-894, 2003.

OVERVOORDE, P.J.; CHAO, W.S.; GRIMES, H.D. A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 15898-15904, 1997.

OVERVOORDE, P.J.; FROMMER, W.B.; SPENCER, D. A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. **Plant Cell.**, v. 8, p. 271-280, 1996.

OVERVOORDE, P.J.; GRIMES, H.D. Topographical analysis of the plasma membrane-associated sucrose binding protein from soybean. **The Journal Biological Chemistry**, v. 269, n. 21, p. 15154-15161, 1994.

OXENDER, D.L.; FOX, C.F. **Protein engineering**. New York: LISS, A.R., Inc., 1987.

PEDRA, J.H.F.; DELU'-FILHO, N.; PIROVANI, C.P.; CONTIM, L.A.S.; DEWEY, R.E.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Science**, v. 152, p. 87-98, 2000.

PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BIELLI, A.; VIRGILIO, M.; FRIGERIO, L.; PESCA, M.; FAORO, F.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Protein quality control along the route to the plant vacuole. **Plant Cell**, v. 9, p. 1869-1880, 1997.

PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. **Plant Journal**, v. 5, p. 103-110, 1994.

PIROVANI, C.P. **Caracterizacao bioquimica da proteina S64, envolvida no transporte de sacarose em soja (Glycine max (L.) Merrill)**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIROVANI, C.P.; MACEDO, J.N.A.; CONTIM, L.A.S.; MATRANGOLO, F.S.V.; LOUREIRO, M.E.; FONTES, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean exhibits GTP-binding activity that functions independently of sucrose transport activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 3998-4008, 2002.

RIESMEIER, J.W.; WILLMITZER, L.; FROMMER, W.B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO JOURNAL**, v. 13, p. 1-7, 1994.

RIESMEIER, J.W.; WILLMITZER, L.; FROMMER, W.B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO JOURNAL**, v. 11, p. 4705-4713, 1992.

RIPP, K.G.; VIITANEN, P.V.; HITZ, W.D.; FRANCESCHI, V.R. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiol. Ogy**, v. 88, p. 1435-1445, 1988.

SARASTE, M.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop-a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends Biochemical Science**, v. 15, n. 11, p. 430-434, 1990.

SCHULER, M.A.; DOYLE, J.J.; BEACHY, R.N. Nucleotide homologies between the glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. **Plant Molecular Biology**, v. 2, p. 119-127, 1983.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochemistry Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemistry Review**, v. 98, p. 637-674, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins-a large family of homologous proteins. **FABES Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SHOEMAKER, K.R.; KIM, P.S.; BREMS, D.N.; MARGUSEE, S.; YORK, E.J.; CHAIKEN, I.M.; STEWART, J.M.; BALDWIN, R.L. Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. **Biochemistry**, v. 82, n. 8, p. 2349-2353, 1985.

SHUTOV, A.D.; KAKHOVSKAYA, I.A.; BRAUN, H.; BAUMLEIN, H.; MUNTZ, K. Legumin and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. **Journal of Molecular Evolution.**, v. 41, p. 1057-1069, 1995.

SHUTOV, A.D.; KAKHOVSKAYA, L.A.; BASTRYGINA, A.S.; BULMAGA, V.P.; HORSTMANN, C.; MUNTZ, K. Limited proteolysis of P-conglycinin and glycinin, the 7s and 11s storage globulins from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Structural and evolutionary implications. **European Journal of Biochemistry**, v. 241, p. 221-228, 1996.

SINGH, S.M.; PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005.

SIRTORI, C.R.; LOVATI, M.R.; MANZONI, C.; MONETTI, M.; PAZZUCCONI, F.; GATTI, E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. **The Journal of Nutrition.**, v. 125, p. 598S-605S, 1995.

SLAVIK, J. Anilinonaphthalene sulphonate as a probe of membrane composition and function. **The Journal of Membrane Biology**, v. 694, p. 1-25, 1982.

SMITH, S.C.; JOHNSON, S.; ANDREWS, J.; MCPHERSON, A. Biochemical characterization of canavalin, the major storage protein of jack bean. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1199-1209, 1982.

STITT, M. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. **The Plant Cell**, v. 8, p. 565-571, 1996.

SUMER, J.B. The globulins of the jack bean, *canavalia ensiformis*. **Journal Biological Chemistry**, v. 37, p. 137-142, 1919.

SUMER, J.B.; HOWELL, S.F. The isolation of a fourth crystallizable jack bean globulin through the digestion of canavalin with trypsin. **Journal Biological Chemistry**, v. 113, p. 607-610, 1936.

SZMELCMAN, S.; SCHWARTZ, M.; SILHAVY, T.J.; BOOS, W. Maltose transport in *Escherichia coli* K12. A comparison of transport kinetics in wild-type and lambda-resistant mutants as measured by fluorescence quenching. **European Journal of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 13-19, 1976.

THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 1117-1121, 1976.

THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 692-695, 1978.

UTSUMI, S. Plant food protein engineering. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 36, p. 89-208, 1992.

UTSUMI, S.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Structure-function relationships of soy proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Eds.). **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 257-291.

VITALE, A.; BIELLI, A.; CERIOTTI, A. The binding protein associates with monomeric phaseolin. **Plant Physiology**, n. 107, p. 1411-1418, 1995.

WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinase and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **The EMBO Journal**, v. 1, n. 8, p. 945-951, 1982.

WARMBRODT, R.D.; VANDERWOUDE, W.J.; HITZ, W.D. Studies on the localization of a protein, immunologically similar to a 62-kilodalton sucrose-binding protein isolated from developing soybean cotyledons, in the shoot and root of spinach. **Plant Physiology**, v. 118, p. 501-511, 1991.

WEBER, G. Energetics of ligand binding to proteins. **Adv. Protein Chemistry**, v. 29, p. 1-83, 1975.

WEISE, A.; BARKER, L.; KÜHN, C.; LALONDE, S.; BUSCHAMANN, H.; FROMMER, W.B.; WARD, J.M. A new subfamily of sucrose transports, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. **Plant Cell**, v. 12, p. 1345-1355, 2000.

WILLIAMS, E.J.; HERSKOVITTS, T.T.; LASKOWSKI, J.R. Location of chromophoric residues in proteins by solvent perturbation. 3. Tryptophyls in lysozyme and in alpha-chymotrypsinogen and its derivatives. **Journal Biological Chemistry**, v. 240, n. 9, p. 3574-3579, 1965.

WILLIAMS, L.; LEMOINE, R.; SAUER, N. Sugar transporters in higher plants a diversity of roles and complex regulation. **Plant Science**, v. 5, n. 7, p.283-290, 2000.

WOO, E.J.; DUNWELL, J.M.; GOODENOUGH, P.W.; PICKERSGILL, R.W. Barley oxalate oxidase is a hexameric protein related to seed storage proteins: evidence from X-ray crystallography. **FEBS Lett**, v. 437, p. 87-90, 1998.